

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS E ENGENHARIA DO AMBIENTE

**CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DE COMPOSTOS DESREGULADORES  
ENDÓCRINOS (EDC) EM ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE ÁGUAS  
RESIDUAIS (ETAR): ESTUDO DA REMOÇÃO DE EDC'S NUMA ETAR COM  
TRATAMENTO TERCIÁRIO**

**POR  
RITA MAURÍCIO RODRIGUES ROSA**

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da  
Universidade Nova de Lisboa para obtenção do grau de Mestre em  
Engenharia do Ambiente – Perfil Engenharia Sanitária

Orientador:  
**Professor Doutor Fernando Santana**

**LISBOA  
2008**

**ISBN**

© Month 2008

**RITA MAURÍCIO RODRIGUES ROSA**

**LEGAL DEPOSIT N°.**

**ISBN: 978-989-20-1110-3**

Universidade Nova de Lisboa  
Faculdade de Ciências e Tecnologia  
Departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente  
Campus da Caparica  
Quinta da Torre  
2029-516 Caparica  
Portugal

## **DECLARAÇÃO DO AUTOR**

A preparação deste manuscrito, incluindo a sua concepção, execução técnica interpretação dos resultados e preparação de artigos publicados incluídos nesta dissertação foram preparados de acordo com o nº. 2 do art. 8 do Decreto-Lei nº. 388/70.

Rita Maurício Rodrigues Rosa

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de expressar os meus sinceros agradecimentos às seguintes pessoas:

Ao Prof. Doutor Fernando Santana pela orientação desta tese, pela confiança depositada durante todos estes anos de trabalho em comum, pelas oportunidades que me tem dado e principalmente pela grande amizade e carinho que sempre fez questão de demonstrar.

À Prof. Doutora Leonor Amaral pelas discussões científicas e ajuda na elaboração deste trabalho. À Prof. Leonor gostaria ainda de lhe agradecer a incondicional amizade que sempre demonstrou durante todos estes anos de trabalho em comum, o espírito de cooperação e interajuda e por todas as conversas de apoio nos momentos menos bons da preparação desta dissertação.

Um agradecimento muito especial ao meu colega Mário Diniz pela camaradagem, espírito de interajuda e enorme amizade que se tornaram fundamentais e imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Ao Francisco Silva pela enorme ajuda nas campanhas de recolha de amostras na ETAR e à Luísa Caldeira pelo apoio no laboratório. Ao Engº. José Martins e à EMARLIS pela cedência do efluente nos diversos pontos em análise da ETAR.

Aos meus amigos e família pela ajuda, apoio e interesse com que sempre acompanharam a evolução deste trabalho.

Finalmente, um agradecimento muito especial ao Vitinho e aos meus pais pelo apoio incondicional na realização deste trabalho.

## ABSTRACT

Since the early 1990s, there has been growing concern about a group of chemical compounds with endocrine activity which are present in the aquatic environment and can have adverse effects on reproduction in humans and wildlife species. Many reported effects have been related to several classes of chemical compounds that are present in wastewater effluent, such as pesticides, aromatic compounds, alkylphenols, phytoestrogens and natural estrogens. In addition, the efficiency to remove these chemicals by the sewage treatment plants (STP) has been questioned since, in some cases, they generate compounds with a higher toxicity than the parent compounds. Therefore, freshwater systems are particularly vulnerable to the presence of endocrine disruptor compounds (EDC) since the proximity to the sources of pollution and the low dilution factor of these waters makes the inhabiting fauna highly exposed.

The main objective of this study was to evaluate the estrogenic potential of a wastewater effluent.

A wastewater treatment plant located in Chelas, a district of Lisbon (Portugal), that receives large volumes of urban wastewater and variable amounts of industrial effluent, was selected as model to carry out studies on the endocrine disruption issue. Thus, some EDC were identified and quantified in the wastewater treatment plant effluent using analytical instrumentation (ELISA, LC-MS-MS, HPLC).

As a global conclusion, the instrumental analysis provided evidence that WWTP effluent contains chemical compounds capable of affecting the endocrine system of fish. As a consequence it can also be concluded that treated domestic from the WWTP possess estrogenic activity.

Additionally, the treated effluent is discharged into the River Tagus estuary and considering that there are various river and estuarine organisms of commercial value that may bio-accumulate EDC and be consumed by humans, and that river water is also used in the production of drinking water, public health problems may arise from the exposure to estrogenic chemicals.

## RESUMO

Desde os anos 90 que se suspeita que um vasto leque de compostos, que estão presentes no ambiente aquático é susceptível de causar disrupção endócrina, podendo provocar efeitos adversos na nível do sistema reprodutor de vários organismos, de entre os quais os surfactantes não-iónicos alquifenois polietoxilatos (APEO), estrogénios, compostos organoclorados, entre outros. Estes, têm sido amplamente utilizados nos últimos 50 anos numa vasta diversidade de aplicações domésticas e comerciais. Durante o tratamento de águas residuais urbanas e industriais, os APEO são degradados sucessivamente até formas menos biodegradáveis, como por exemplo o NP (nonilfenol) e o OP (octilfenol), acabando por ser descarregados no ambiente aquático.

A informação disponível, relativamente ao efeito das elevadas descargas nos meios receptores e da sua potencial toxicidade é ainda muito limitada, nomeadamente em sistemas aquáticos. Por outro lado, a informação sobre remoção de EDC em estações de tratamento de águas residuais (ETAR) é igualmente muito escassa, circunstância que impede a realização de estimativas de balanços materiais, indispensáveis à previsão dos correspondentes impactes nos meios hídricos, pelo que, este estudo teve como principal objectivo, a avaliação do potencial estrogénico de um efluente de uma ETAR com tratamento terciário.

O presente estudo foi realizado na ETAR de Chelas, em Lisboa (Portugal). O efluente da ETAR é caracterizado por não ser só, efluente doméstico mas também ser constituído por quantidades significativas de efluente industrial. A escolha desta ETAR para realizar este estudo recaiu também na sua linha de tratamento, isto é, a ETAR possui tratamento terciário com remoção de azoto e desinfecção final do efluente através de U.V.

De forma a detectar e quantificar o potencial estrogénico de uma água seleccionaram-se compostos específicos, isto é alguns EDC “alvo”, nomeadamente: (i) nonilfenol e octilfenol (NP e OP); (ii) bisfenol A (BPA) e (iii) 17  $\beta$ -estradiol (E2).

Foram utilizadas três técnicas diferentes para identificar e quantificar os EDC seleccionados ELISA, LC-MS-MS e HPLC. As técnicas foram igualmente comparadas.

Em todos os casos, isto é, independentemente da técnica analítica usada ficou demonstrado que os EDC seleccionados estavam presentes no efluente da ETAR,

variando as suas concentrações de composto para composto e também ao longo da linha de tratamento da ETAR, e que ainda são descarregadas, no Estuário do Tejo, níveis de concentrações que poderão causar efeitos fisiológicos na vida animal. Contudo, devido ao elevado nível de diluição existente no Estuário do Tejo (caudais muito grandes) os efeitos nos organismos poderão não ser relevantes e, ou imediatos.

Os níveis mais elevados de APE (NP e OP) foram detectados no afluente à ETAR e os menores no efluente da ETAR. O valor mais elevado de E2 foi registado após a decantação primária. A variação de E2 ao longo da linha de tratamento foi pouco significativa, facto este que poderá estar relacionado também com a “cross-reactivity”, bem como a própria actividade microbiológica existente numa água residual. Os maiores valores para o BPA foram obtidos nas lamas primárias (acima dos limites de detecção), tendo sido registada uma redução significativa deste composto ao longo da linha de tratamento, o que poderá indicar que a ETAR de Chelas remove eficientemente este composto.

## SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ANOVA – Analysis of Variance

APEs – Alkylphenol Poly Ethoxylates

BOD<sub>5</sub> – Biochemical Oxygen Demand

BPA - Bisphenol A

CBO<sub>5</sub> – Carência Bioquímica de oxigénio (mesmo que BOD<sub>5</sub>)

COD – Chemical Oxygen Demand

CQO - Carência Química de oxigénio (mesmo que COD)

DDT - 4, 4-dichloro-diphenyl-trichloroethane

DES - DIETHYLSTILBESTROL

E1 - Estrone

E2 – 17 $\beta$ - estradiol

E3 - Estriol

EE2 – 17  $\alpha$ - ethynylestradiol

EDC – Endocrine Disruptor Compounds ou Composto Desregulador Endócrino

ED's - Endocrine Disruptor Compounds ou Composto Desregulador Endócrino

EIA – Enzyme Immuno Assay

ELISA – Enzyme Linked Immuno Assay

ER – Estrogen receptor

EU – European Union

GC – Gaseous Chromatography ou Cromatografia Gasosa

GC – MS – Gaseous Chromatography coupled to Mass Spectrometry ou Cromatografia Gasosa associada a um Detector de Massa

GSI – Gonadosomatic index ou Índice Gonodossomático

HPLC – High Performance Liquid Chromatography ou Cromatografia Líquida de Alta Performance

HSI – Hepatosomatic index

KI - Somatic condition index

LC – Liquid Chromatography ou Cromatografia Líquida

LC – MS – MS - Liquid Chromatography / Mass Spectrometry / Mass Spectrometry ou Cromatografia Líquida associada a dois Detectores de Massa em série

N – Nitrogen ou Azoto

NP – Nonylphenol ou Nonilfenol

OP – Octylphenol ou Octilfenol



P – Phosphorous ou Fósforo  
PAH - polycyclic aromatic hydrocarbons ou Hidrocarbono policíclico aromático  
PBS - phosphate buffered saline  
PBS Tween – phosphate buffered saline with Tween  
PCB - polychlorinated biphenyls  
SPE – Solid Phase Extraction  
TSS – Total Suspended Solids ou Sólidos Suspensos Totais  
VSS – Volatil Suspended Solids ou Sólidos Suspensos Voláteis  
STP – Sewage Treatment Plant  
T – Testosterone  
Vtg – Vitellogenin  
WWTP – Wastewater Treatment Plant  
USA - United States of America  
11 – KT – 11-Ketotestosterone

## ÍNDICE

Agradecimentos .....	iii
Abstract .....	iv
Resumo .....	v
Símbolos e Abreviaturas .....	vii
<b>1. Introdução .....</b>	<b>1</b>
1.1. Enquadramento.....	2
1.2. Identificação, Quantificação e Análise .....	3
1.3. Presença de EDC no Ambiente . Fontes de EDC.....	4
1.4. Presença de EDC em ETAR .....	6
1.4.1. <i>Presença de EDC nos Processos de Tratamento de Águas Residuais e Lamas</i> .....	7
1.4.1.1. Tratamento Preliminar .....	8
1.4.1.2. Tratamento Primário .....	8
1.4.1.3. Tratamento Secundário .....	9
1.4.1.4. Processos de Nitrificação e Tratamento Secundário.....	10
1.5. Impactes dos EDC nos organismos vivos .....	12
1.5.1. Efeitos dos EDC nos Humanos .....	12
1.5.2. Efeitos dos EDC nos Invertebrados, Peixes, Répteis e Anfíbios, Pássaros e Mamíferos .....	13
1.6. Métodos para determinação de EDC .....	15
1.6.1. <i>Ensaaios “In Vitro”</i> .....	15
1.6.1.1. Ligação Competitiva de um Ligando (“Competitive Ligand Binding”) ..	15
1.6.1.2. Técnicas de Proliferação de Células.....	16
1.6.1.3. Ensaaios Recombinantes Receptor – Resposta (“Recombinant Receptor – Reporter Assays”).....	17
1.6.2. <i>Ensaaios “In Vivo”</i> .....	19
1.6.3. <i>Técnicas Físico- Químicas</i> .....	19
1.6.3.1. Técnicas Físico- Químicas para determinação de EDC em águas residuais .....	19
1.6.4. <i>Outras Técnicas</i> .....	21
<b>2. Objectivos e Estrutura da Tese.....</b>	<b>25</b>
2.1. Objectivos Gerais.....	26
2.2. Estrutura da Tese.....	29
<b>Referências .....</b>	<b>31</b>

<b>3. Selecção da Estação de Tratamento de Águas Residuais (ETAR)</b> .....	39
3.1. Descrição da Estação de Tratamento de Águas Residuais (ETAR) de Chelas, Lisboa .....	40
3.2. Dados de Funcionamento .....	41
 <b>4 – Caracterização de Compostos Desreguladores Endócrinos Seleccionados Numa Estação de Tratamento de Águas Residuais Portuguesa. Comparação de Metodologias. Efeitos De EDC em Peixes</b> .....	44
4.1. A characterization of selected endocrine disruptor compounds in a portuguese wastewater treatment plant .....	45
4.2. Avaliação da remoção do nonilfenol numa estação de tratamento de águas residuais urbanas. Efeitos da Exposição em carpas ( <i>Cyprinus carpio</i> ) .....	67
4.3. Avaliação do Potencial Estrogénico e Caracterização Físico-Química da ETAR de Chelas (Lisboa) .....	80
4.5. Screening Endocrine Disruptors Compounds in a Portuguese Wastewater Treatment Plant using Enzyme Linked Immunoassay (ELISA) .....	105
4.6. Assessing the estrogenic potency in a Portuguese wastewater treatment plant - A multi-level approach .....	112
 <b>5. Discussão e Conclusões</b> .....	137
5.1. Presença de EDC numa ETAR portuguesa .....	139
5.2. Desenvolvimentos futuros .....	141

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Diagrama linear simplificado de uma ETAR. ....	8
Figura 2 – Mecanismo de remoção de EDC durante a decantação primária .....	9
Figura 3 – Mecanismos de remoção de EDC durante o tratamento secundário numa ETAR. ....	10
Figura 4 - resposta estrogénica num sistema de “yeast” .....	18
Figura 5 - Cromatograma, obtido por LC com detector por fluorescência, relativo ao bisfenol A, 17 $\beta$ estradiol, etinilestradiol, octilfenol e nonilfenol .....	21
Figura 6 – Leitor de ELISA .....	23
Figura 7 - Diagrama que sumariza a determinação dos EDC seleccionados .....	28

Figura 8 - Linha de tratamento da ETAR de Chelas.....	40
Figura 9 – Localização da ETAR.....	42
Figura 10 – Decantador primário.....	43
Figura 11 – Decantador secundário .....	43
Figura 12 – Sistema de desinfecção por U.V. ....	43
Figura 13 - Filtro.....	43

## ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Principais classes de estrogénios presentes no ambiente.....	6
Quadro 2 – Percentagem de remoção de alguns EDC .....	11
Quadro 3 - Alguns testes desenvolvidos e alguns dos compostos avaliados .....	16
Quadro 4 - Algumas técnicas desenvolvidas e alguns dos compostos avaliados.....	17
Quadro 5 - Principais parâmetros de funcionamento da ETAR de Chelas. ....	41

## ÍNDICE DOS ARTIGOS

### **4.1. A Characterization of selected Endocrine Disruptor Compounds in a Portuguese Wastewater Treatment Plant**

Abstract .....	46
1. Introduction .....	47
2. Materials and Methods.....	49
2.1. WWTP selection – Chelas (Lisbon) .....	49
2.2. Selection of chemical compounds .....	51
2.3. Sample collection .....	52
2.4. Wastewater Sample Pre-treatment and Extraction .....	52
2.5. Sludge Sample Pre-treatment and Extraction.....	53
2.6. Enzyme Linked Immuno Assay (ELISA). ....	53
2.7. Liquid Chromatography (LC) - (MS) - (MS).....	54
3. Results and Discussion .....	57
4. Conclusions .....	62
References .....	63

#### **4.2. Avaliação da Remoção do Nonilfenol numa Estação de Tratamento de Águas Residuais Urbanas. Efeitos da Exposição em Carpas (*CYPRINUS CARPIO*)**

Resumo .....	68
1. Introdução.....	69
2. Materiais e Métodos.....	72
2.1. Análise de NP em Águas Residuais .....	72
2.2 Recolha das Amostras de Águas Residuais .....	72
2.3. Processamento das Amostras.....	73
2.4. Testes de Exposição em Carpas.....	73
3. Resultados e Discussão.....	75
4. Referências Bibliográficas.....	79

#### **4.3. Avaliação do Potencial Estrogénico e Caracterização Físico-Química da ETAR de Chelas (Lisboa)**

Resumo .....	81
Introdução.....	82
Materiais e Métodos.....	84
Resultados e Discussão.....	88
Conclusões .....	91
Referências bibliográficas .....	92

#### **4.4. Avaliação da remoção de compostos disruptores endócrinos presentes nas águas residuais urbanas**

Resumo .....	95
Introdução.....	96
Materiais e métodos.....	98
Resultados.....	102
Conclusões .....	103
Bibliografia .....	104

#### **4.5. Screening Endocrine Disruptors Compounds in a Portuguese Wastewater Treatment Plant using Enzyme Linked Immunoassay (ELISA).**

Abstract .....	106
Introduction .....	107
Materials and Methods.....	108
Discussion and Results.....	109
References .....	111

#### **4.6. Assessing the Estrogenic Potency in a Portuguese Wastewater Treatment Plant - - A Multi-Level Approach**

Abstract .....	113
Introduction .....	114
Experimental.....	116
Statistical Analysis .....	121
Results.....	121
Discussion .....	126
Literature Cited .....	130

### **ÍNDICE DAS FIGURAS DOS ARTIGOS**

#### **4.1. A Characterization of selected Endocrine Disruptor Compounds in a Portuguese Wastewater Treatment Plant**

Figure 1 - Diagram of the WWTP treatment steps and sampling points .....	50
Figure 2 - Chemical structure of selected compounds.....	51

#### **4.2. Avaliação da Remoção do Nonilfenol numa Estação de Tratamento de Águas Residuais Urbanas. Efeitos da Exposição em Carpas (*CYPRINUS CARPIO*)**

Figura 1 – Avaliação do balanço de massa do nonilfenol numa ETAR, e análise da exposição em peixes.....	71
Figura 2 – Identificação dos pontos de amostragem na linha de tratamento da ETAR de Chelas .....	72
Figura 3 – Evolução da concentração de nonilfenol ao longa da ETAR .....	75

Figura 4. – Percentagens de Remoção .....	76
Figura 5 - Teores de NP em músculo, rim, gónada e fígado de carpa.....	77
Figura 6 - Índice Gonadosomático em carpas expostas a 0, 25 e 100 µg/l de NP.....	77
Figura 7 - Gónada de <i>Cyprinus carpio</i> (macho) .....	78

#### **4.3. Avaliação do Potencial Estrogénico e Caracterização Físico-Química da ETAR de Chelas (Lisboa)**

Figura 1 – Esquema da linha de tratamento da ETAR de Chelas .....	85
Figura 2 - a – ETAR de Chelas (Dec. secundários); b – UV .....	85
Figura 3 – Esquema do processamento e análise de amostras .....	86

#### **4.4. Avaliação da remoção de compostos disruptores endócrinos presentes nas águas residuais urbanas**

Figura 1 – Avaliação do balanço de massa dos ED's numa ETAR .....	99
Figura 2 – Linha de tratamento da ETAR de Chelas (fase líquida).....	101
Figura 3 – Evolução da concentração de NP ao longo da ETAR .....	103

#### **4.6. Assessing the Estrogenic Potency in a Portuguese Wastewater Treatment Plant - - A Multi-Level Approach**

Figure 1 - Vtg concentrations in exposed fish.....	122
Figure 2 - Vtg concentrations in liver and gonad homogenates. ....	123
Figure 3 - Steroid concentrations in fish exposed to the different concentrations of treated effluent. ....	123
Figure 4 - Gonadosomatic and hepatosomatic indices.....	124
Figures - 5a and b - Ovo-testis in fish exposed to 100% treated effluent.....	125

### **ÍNDICE DOS QUADROS DOS ARTIGOS**

#### **4.1. A Characterization of selected Endocrine Disruptor Compounds in a Portuguese WasteWater Treatment Plant**

Table I - Technical data from Chelas WWTP. ....	50
Table II - ELISA detection limits .....	54
Table III - LC-MS/(MS) conditions and limits of detection .....	56

Table IV – EDC concentrations measured by ELISA and LC-MS-MS. ....	57
Table V – EDC's removal (%) in each step of WWTP .....	60
Table VI - Cross-reactions of ELISA with APE, Bisphenol A, and 17 $\beta$ -Estradiol (E2). .	61

#### **4.3. Avaliação do Potencial Estrogénico e Caracterização Físico-Química da ETAR de Chelas (Lisboa)**

Quadro 1 - concentrações de EDCs em alguns pontos-chave da linha de tratamento da ETAR. ....	89
Quadro 2 – Resultados das amostras obtidos através de ELISA .....	89
Quadro 3 - parâmetros físico-químicos determinados (valores médios). ....	91

#### **4.5. Screening Endocrine Disruptors Compounds in a Portuguese Wastewater Treatment Plant using Enzyme Linked Immunoassay (ELISA).**

Table 1 – EDC Results by ELISA in samples .....	109
Table 2 – EDC Results LC-MS-MS .....	109

#### **4.6. Assessing the Estrogenic Potency in a Portuguese Wastewater Treatment Plant - - A Multi-Level Approach**

Table 1 - Alkylphenolic compounds and BPA concentrations ( $\mu$ g/l) in samples measured by LC-MS-MS .....	126
Table 2 - Steroids concentrations (ng/l) in samples measured by LC-MS-MS .....	126



## **1. INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

A OCDE definiu como composto desregulador endócrino (EDC), uma substância exógena que causa efeitos adversos na saúde de um organismo, e sua descendência, em consequência de alterações ao nível da função endócrina (Jounay, 2000).

### 1.1. Enquadramento

Desde do início dos anos 90 que tem havido um crescente interesse no fenómeno de desregulação endócrina devido ao possível efeito adverso que pode provocar na saúde de homens e animais (Tyler *et al.*, 1998; Vos *et al.*, 2000; Kinnberg and Toft, 2003).

Os primeiros estudos que relacionaram o efeito de determinados químicos em animais surgiram durante os anos 50 e 60 por Rachel Carson, que relacionou os impactes do DDT no ambiente e em animais (Carson, 1962). No entanto, a preocupação pública generalizada para os problemas da poluição só surgiu com a publicação do livro “*Our Stolen Future: Are We Threatening Our Fertility, Intelligence and Survival?*”. Como resultado desta publicação foram organizados vários “workshops”, conferências, programas de investigação etc. (e.g. IEH, 1995; European Commission, 1996; Tattersfield *et al.*, 1997; Kendall *et al.*, 1998).

Nas últimas décadas foram realizados vários estudos que relacionam propriedades de desregulação endócrina de determinados compostos (naturais e produzidos pelo homem) principalmente ao nível da actividade hormonal (Tyler *et al.*, 1998; Lindholm *et al.*, 2001).

Com a constatação da existência de níveis significativos de compostos com capacidade de desregulação endócrina no ambiente, surgiu a necessidade de criação de uma definição de Composto(s) Desregulador(es) Endócrino (EDC). Contudo, esta definição, ainda hoje, não é consensual, existindo várias alternativas na bibliografia (European Commission, 1996; Solé *et al.*, 2001, Baker, 2001).

No entanto, todas as tentativas de definição de EDC incluem o conceito de desregulação ou disrupção - qualquer tipo de efeito (adverso ou não) no sistema endócrino. Este facto está relacionado com o argumento de que pequenas alterações bioquímicas ou pequenas alterações a nível celular poderão provocar grandes danos a longo prazo. Na verdade, ocorrem sistematicamente alterações do sistema endócrino devido a factores ambientais naturais e, por vezes, as pequenas perturbações provocadas pelos compostos antropogénicos descarregados no ambiente nem sequer provocam qualquer tipo de patologia. A questão será até que ponto ou até que concentração de compostos desreguladores endócrinos é que cada indivíduo exposto se consegue adaptar sem que para isso surja qualquer tipo de patologia. As consequências a esta exposição poder-se-ão manifestar também não só ao nível do indivíduo exposto, mas também ao nível da sua descendência, isto é poderão existir efeitos e alterações a nível da população (Matthissen e Sumpter, 1998).

## **1.2. Identificação, Quantificação e Análise**

Para além de não existir uma definição consensual para EDC, também não existe consenso quanto aos métodos de determinação, quantificação, análise e ensaios nos vários tipos de organismos.

A escolha e desenvolvimento apropriado para identificação e caracterização de compostos químicos que podem desregular o sistema endócrino é por si só muito complicada. Por exemplo, o receptor deste tipo de compostos não segue as regras normais de toxicidade devido aos níveis endógenos de hormonas que estão presentes no corpo. Os EDC podem actuar através de vias diferentes dos outros compostos, originando respostas distintas, mesmo quando presentes a concentrações extremamente baixas. Por outro lado, existe um grande número de testes disponíveis, muitos dos quais não são validados e são baseados numa gama de mecanismos completamente diferentes (Diniz, 2005).

De forma a poder estabelecer uma harmonia internacional de análise para os EDC, a OCDE, no encontro realizado em Novembro de 1996 (25th Joint Meeting of the OCDE Environmental Health and Safety Programme), criou uma actividade específica para criação de linhas orientadoras para determinação de EDC em mamíferos e não mamíferos. Apesar de terem sido identificados alguns testes bastante promissores,

desse encontro não resultou qualquer tipo de orientação e, ou recomendação para testes *in vitro* e *in vivo*.

Actualmente não existem linhas orientadoras específicas para determinação de EDC (Diniz, 2005).

### **1.3. Presença de EDC no Ambiente . Fontes de EDC**

De acordo com vários autores existem entre 50 a 70 compostos diferentes que foram identificados como sendo possíveis EDC (Matthiesen e Gibbs, 1998, Ishibashi *et al.*, 2001, Diniz, 2005). Contudo, à medida que mais compostos químicos são testados, o número dos que demonstram ter resposta estrogénica também aumenta, isto é, a lista de compostos considerados EDC está longe de estar fechada, não tendo parado de aumentar com a evolução da tecnologia e dos novos testes que têm surgido.

Uma das formas mais comuns de exposição dos organismos com os EDC é através do contacto com a água contaminada (rios, albufeiras, águas subterrâneas, etc.). Os EDC podem contaminar a água de várias formas:

Fontes pontuais – efluentes de estações de tratamento de águas residuais, efluentes de indústrias, efluentes da actividade agrícola, lixiviados, etc..

Fontes difusas – infiltração no solo de compostos utilizados na agricultura e indústria, até atingirem os lençóis freáticos, recarga de aquíferos com água contaminada, fossas sépticas, espalhamento de lamas provenientes do tratamento de águas residuais etc..

Os EDC, à semelhança de outros poluentes, têm uma grande variedade de fontes. Estas fontes podem ter implicações no ambiente (através da sua acumulação) e efeitos adversos para humanos e para todos os outros tipos de organismos vivos (Birkett, 2003 e Diniz, 2005).

As águas superficiais são particularmente vulneráveis à contaminação por EDC, devido à sua proximidade com as fontes poluidoras e devido ao seu baixo factor de diluição, o que origina um elevado grau de exposição de todos os organismos que com elas contactam. Para além disso, quando se trata de EDC, o tratamento realizado às águas residuais (nas ETARs) é posto em causa. Este facto deve-se a que em

determinados casos os produtos de degradação resultantes dos processos metabólicos presentes nas ETARs, são mais tóxicos que os seus antecessores, isto é, têm um poder estrogénico superior. Um exemplo deste fenómeno são os compostos surfactantes não-iónicos alquifenois polietoxilatos (APEOs), que se degradam em nonilfenol . Estes, têm sido amplamente utilizados nos últimos 50 anos numa vasta diversidade de aplicações domésticas e comerciais (Tsuda, *et al.*, 2000), sendo usados como emulsionantes nos produtos de limpeza industriais, e domésticos (Nichols, *et al.*, 2001). Durante o tratamento de águas residuais urbanas e industriais, os APEOs são degradados sucessivamente até formas menos biodegradáveis, como por exemplo o NP (nonilfenol) e o OP (octilfenol), acabando por ser descarregados no ambiente aquático (Maguire, 1999; Arukwe, 2000).

Para além disso, foi demonstrado que os alquifenois como o nonilfenol ou o octilfenol, induzem a produção de vitelogenina em indivíduos machos de diversas espécies de peixes (Schwaiger, *et al.*, 2000; Jobling *et al.*, 1996).

Outros contaminantes estrogénicos encontrados no meio aquático incluem o etinilestradiol, fitoestrogénios, compostos organoclorados, entre outros susceptíveis de desregular o sistema endócrino de peixes e outros organismos.

Para além disso o 17- $\beta$ -estradiol, é o principal estrogénio presente nos vertebrados, que nas fêmeas dos peixes regula o desenvolvimento e manutenção das gónadas e características sexuais somáticas e possui um papel crucial na vitelogénese (Ashfield *et al.*, 1998). Por isso, o estudo da sua concentração no meio e os efeitos ao nível do sistema endócrino dos peixes é da maior importância.

Outro grande grupo de EDC são os metais pesados, como o cádmio, o chumbo e o mercúrio, que apesar de não interferirem com a actividade hormonal, quando presentes em concentrações elevadas, são tóxicos para as células das gónadas dos peixes (Davis *et al.*, 1999).

No Quadro 1. mostram-se as principais classes de estrogénios presentes no ambiente (adaptado de Arukwe, 2001)

Quadro 1. Principais classes de estrogénios presentes no ambiente adaptado de Arukwe, 2001

Poluentes Ambientais	Químicos Industriais	Químicos Farmacêuticos	Misturas Complexas
DDT	Compostos Bromados	Etinil estradiol	Efluentes de ETARs
Dioxinas	BPA	Dietil estilbestro	Efluentes de Indústrias
Kepone	Surfatantes não iónicos	Norgestrel	Partículas existentes no ar
PCB's	Endosulfatantes	Gestodene	Determinados extractos de sedimentos
PAH's	Ésteres fetalatos	Contraceptivos	Determinados extractos de tecido biológico

#### 1.4. Presença de EDC em ETAR

Nos países desenvolvidos o volume produzido de águas residuais provenientes de ETAR pode ser bastante significativo, tendo em consideração o caudal de determinados rios inseridos nas áreas urbanas (Sumpter, 1997). Obviamente, o volume e qualidade de uma água residual descarregada para um determinado rio, relacionado com o próprio caudal do rio e com as condições ambientais envolventes (ex. condições meteorológicas), condicionam o grau de estrogenicidade desse rio. A contribuição de caudal de águas residuais tratadas para um determinado rio, chega a ser, em determinados casos, de cerca de 80 a 90 % do caudal, em alturas de pouca precipitação (Diniz, 2005).

Em vários estudos realizados em diferentes países mostrou-se que as águas residuais tratadas continham estrogénios, naturais e farmacêuticos, provenientes da rejeição humana e estrogénios provenientes de indústrias, capazes de induzir uma resposta estrógena em animais aquáticos (Purdom *et al.*, 1994, Sumpter e Jobling, 1995, Folmar *et al.*, 2001). Contudo, a informação disponível, relativamente ao efeito das elevadas descargas nos meios receptores e da sua potencial toxicidade é ainda muito limitada, nomeadamente em sistemas aquáticos. Por outro lado, a informação sobre remoção de EDC em estações de tratamento de águas residuais (ETAR) é igualmente

muito escassa, circunstância que impede a realização de estimativas de balanços materiais, indispensáveis à previsão dos correspondentes impactes nos meios hídricos.

Desta forma, para uma correcta interpretação dos riscos ambientais associados a estes compostos, há que adoptar uma abordagem integrada, envolvendo os respectivos fluxos materiais, desde a sua origem, às ETAR, aos solos, às reservas de águas e à sua relação com os indivíduos expostos.

Diversos estudos mostram que os sistemas de tratamento de águas residuais removem EDC. Contudo, (i) a estroginicidade dos efluentes dos sistemas convencionais (apenas com tratamento secundário) ainda é muito elevada; (ii) não é evidente que as eficiências daqueles sistemas possam melhorar significativamente por alteração da sua operação, o que implica que para o controlo de EDC descarregados seja necessário recorrer a tratamento terciário destes efluentes. Para além disso, os processos usados para remoção de EDC em ETAR apresentam eficiências de remoção muito variáveis consoante a natureza e composição da água.

#### **1.4.1. Presença de EDC nos Processos de Tratamento de Águas Residuais e Lamas**

A natureza não polar e hidrofóbica de muitos EDC sugere que estes compostos fariam ligados à fase particulada, isto é, operações unitárias mecânicas de separação, como a sedimentação / decantação, teriam eficiências de remoção muito significativas na fase aquosa, isto é existiria uma transferência da fase líquida para as lamas primárias ou secundárias (fase sólida), consoante a fase de tratamento em análise.

Contudo, o que se verifica na realidade, é que a eficiência de remoção de EDC numa ETAR depende, não só da natureza do EDC a ser removido, como também dos próprios processos de tratamento existentes na ETAR (Birkett e Lester, 2003). De uma forma geral, os EDC podem ser removidos de uma água residual através de quatro vias: (1) adsorção aos sólidos suspensos e, ou gorduras e óleos presentes numa água residual; (2) biodegradação aeróbia ou anaeróbia; (3) degradação química (ex. através de processos como a hidrólise); (4) volatilização.

O tratamento convencional de uma ETAR, normalmente, é constituído por três estágios: (i) tratamento preliminar, (ii) tratamento primário; (iii) tratamento secundário (Lester *et al.*, 2000 e Hamer *et al.*, 1997) representado esquematicamente na Figura 1.

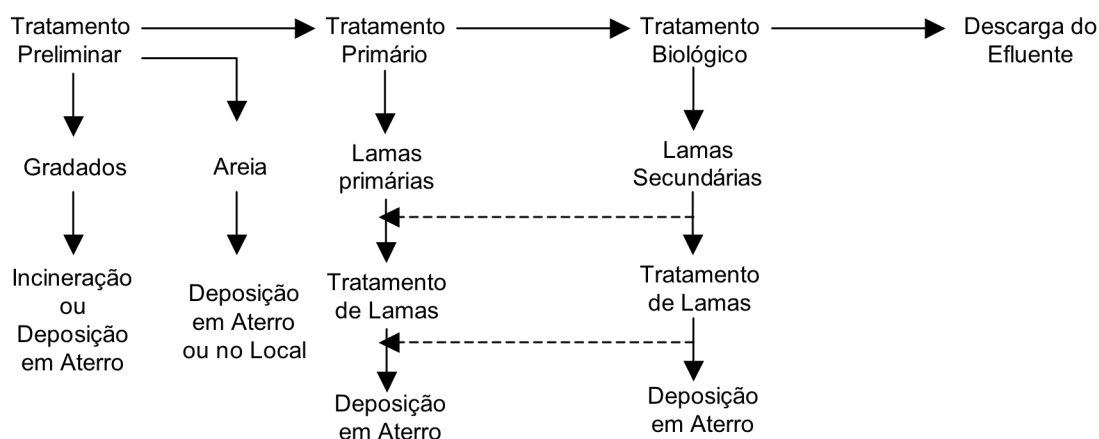


Figura 1 – Diagrama linear simplificado de uma ETAR (adaptado de Lester *et al.*, 2000 e Hamer *et al.*, 1997).

#### 1.4.1.1. Tratamento Preliminar

O tratamento preliminar é constituído normalmente por uma gradagem onde há uma remoção significativa de flotantes e sólidos de maiores dimensões, cujo tamanho é superior ao espaçamento entre barras (Lester *et al.*, 2000), no entanto, nesta fase a remoção de EDC é muito pequena, sendo na maior parte dos casos insignificante.

#### 1.4.1.2. Tratamento Primário

A remoção de EDC no tratamento primário realiza-se maioritariamente através da adsorção aos sólidos, que pela acção da força da gravidade sedimentam para o fundo do decantador. A quantidade de EDC removida nesta etapa está muito



dependente com quantidade de sólidos removidos. Por sua vez, a quantidade de sólidos removido está directamente relacionada com (i) características de sedimentação das partículas (densidade, tamanho, capacidade de floculação); (ii) tempo de retenção e (iii) carga hidráulica (Lester *et al.*, 2000).

Por outro lado, a remoção de compostos orgânicos também pode ser afectada pela temperatura, isto é, quanto menor a temperatura maior a remoção de compostos orgânicos, influenciando, por isso também, a remoção de EDC nesta operação. Na Figura 2 mostram-se os mecanismos possíveis de remoção de EDC na decantação primária.

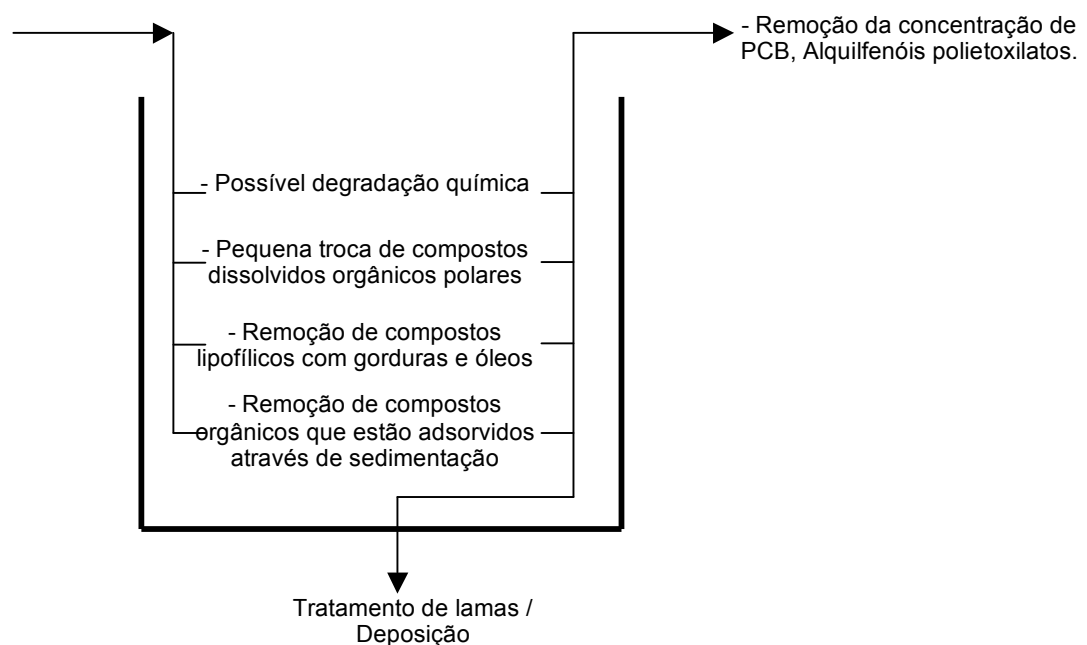


Figura 2 – Mecanismo de remoção de EDC durante a decantação primária (adaptado de Lester *et al.*, 2000).

#### 1.4.1.3. Tratamento Secundário

O tratamento secundário pode envolver processos biodegradativos anaeróbios, contudo, os processos mais comuns nas ETAR são os processos aeróbios (Rogers *et al.*, 1996). O princípio dos processos aeróbios secundários baseia-

-se no contacto de bactérias aeróbias e outros microrganismos com a água residual, em contacto com oxigénio, para conversão dos compostos orgânicos em biomassa, dióxido de carbono e água.

O mecanismo de remoção de EDC durante o tratamento secundário é mostrado na Figura 3. A remoção de EDC nesta etapa inclui processos de adsorção destes poluentes aos flocos microbiológicos e consequente remoção nas lamas secundárias, processos de degradação biológica e química e transformação e volatilização durante o arejamento.

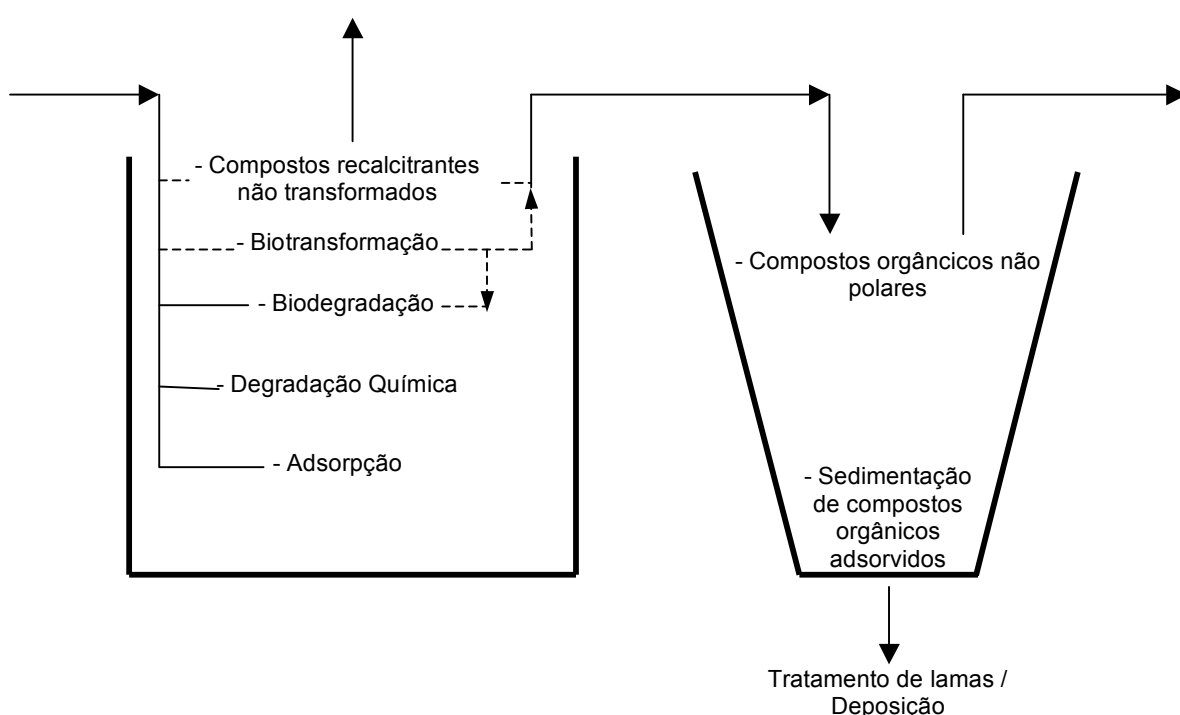


Figura 3 – Mecanismos de remoção de EDC durante o tratamento secundário numa ETAR (adaptado de Lester *et al.*, 2000).

#### 1.4.1.4. Processos de Nitrificação e Tratamento Secundário

Segundo Lester *et al.*, o processo de nitrificação (conversão de amónia a nitrato) também pode ocorrer durante o tratamento secundário, e poderá representar um benefício para a remoção de EDC. No entanto e como a conversão de amónia a nitrato ocorre em dois passos, pela acção de bactérias autotróficas (normalmente

*Nitrosomonas spp.* e *Nitrobacter spp.*) que têm taxas de crescimento muito lentas (idades de lamas elevadas), e requerem grandes quantidades de oxigénio o processo torna-se bastante dispendioso.

Relativamente ao tratamento terciário, algumas das operações unitárias que o constituem também podem melhorar significativamente a remoção de EDC. No Quadro 2 mostra-se alguns dos processos de tratamento, operações unitárias e condições físicas relevantes para uma elevada remoção de alguns EDC.

Quadro 2 – Percentagem de remoção de alguns EDC e respectivos processos de tratamento

Composto (EDC)	Tipo de Processo	Eficiência de Remoção
PCB (Morris <i>et al.</i> , 1994)	Biofiltração	90%
	Lamas Activadas	96%
	Biofiltração + Lamas Activadas	99%
Nonilfenol (NP) (Ahel <i>et al.</i> , 1994)	Lamas activadas (alta carga) sem nitrificação	37%
	Lamas activadas (baixa carga) com nitrificação	77%
Nonilfenol polietoxilato (NP <sub>1</sub> EO) (Ahel <i>et al.</i> , 1994)	Lamas activadas (alta carga) sem nitrificação	- 3% (produzido como produto da degradação do NP)
	Lamas activadas (baixa carga) com nitrificação	31%
Nonilfenol polietoxilato (NP <sub>2</sub> EO) (Ahel <i>et al.</i> , 1994)	Lamas activadas (alta carga) sem nitrificação	- 5% (produzido como produto da degradação do NP)
	Lamas activadas (baixa carga) com nitrificação	91%
Nonilfenol polietoxilato (NP <sub>6</sub> EO) (Ahel <i>et al.</i> , 1994)	Lamas activadas (alta carga) sem nitrificação	78%
	Lamas activadas (baixa carga) com nitrificação	98%
17β-estradiol / 17α-etinilestradiol (Huang <i>et al.</i> , 2001)	Filtração com areia	70%
	Microfiltração + osmose inversa	95%

## **1.5. Impactes dos EDC nos organismos vivos**

Um dos impactes mais evidentes dos EDC é a interferência evidente com a reprodução e desenvolvimento nos organismos. Vários estudos descreveram os potenciais efeitos dos EDC nos humanos e em várias espécies de organismos, dando sempre muita ênfase à necessidade de um melhor entendimento e conhecimento sobre a presença e persistência de EDC (Harries *et al.*, 1996; Jobling *et al.*; 1998, Sumpter, 1995; Folmar *et al.*, 2001).

A grande maioria dos EDC desregula funções normais dos esteróides a nível do aparelho reprodutor provocando, em muitos casos, um fenómeno de feminização dos machos. Este fenómeno foi reportado para todas as classes de vertebrados (Ashby *et al.*, 1997; Kloas *et al.*, 1999; Kinner and Toft, 2003), no entanto, existe uma questão que permanece: Será que as concentrações a que estão presentes estes compostos no ambiente causam efeitos adversos na reprodução do individuo e consequentemente representam uma potencial ameaça a nível da população? (Koger *et al.*, 2000)

### **1.5.1. Efeitos dos EDC nos Humanos**

Durante as últimas duas décadas foi registado um aumento anormal de desregulações patológicas principalmente no sistema reprodutivo masculino, nomeadamente, diminuição da quantidade e qualidade do esperma, cancro dos testículos e próstata (Toppari *et al.*, 1995). Recentemente foi sugerido que estas anomalias registadas resultavam da exposição à poluição por compostos antropogénicos que possuem características desreguladoras endócrinas (Colborn *et al.*, 1993; Toppari *et al.*, 1995).

Outro aspecto importante, também já documentado, são os efeitos nos grupos de risco (crianças, idosos, mulheres grávidas etc.) onde doses extremamente baixas podem provocar danos significativos, mais concretamente, efeitos ao nível do sistema reprodutor nos adultos e problemas de desenvolvimento em recém nascidos, provocados por determinados metais pesados (ex. chumbo e mercúrio), pesticidas (ex

DDT), químicos utilizados em processos industriais (ex. PCBs), solventes e outras substâncias (Foster, 1998).

A presença de pequenas quantidades de muitos EDC no ambiente constitui uma preocupação crescente, porque ou sozinhos ou em misturas complexas, estes compostos contribuem para o aparecimento de várias doenças, nomeadamente cancro, alergias, impactos no sistema reprodutor e imunitário, bem como efeitos neurotóxicos (UCB, 1997; NRC, 1992; Kilburn, 1998). Para além da concentração a que os indivíduos são expostos, outro aspecto muito relevante é o tempo de exposição. No entanto, para certos EDC e para determinadas alturas, para que causem danos de magnitude significativa, não é necessário um elevado tempo de exposição (ex. contacto com EDC durante os primeiros 30 dias de gestação poderá provocar danos irreversíveis) (Brekine, 1997).

Contudo, e apesar do número elevado dos estudos já realizados, é difícil e complexo identificar uma clara e evidente relação entre os impactos e patologias e possíveis exposições das pessoas a esses compostos (com excepção de exposições ocupacionais) uma vez que a exposição é em relação a várias substâncias e efectuada por diferentes vias (ar, água alimentos etc.) (Wallace, 1993).

#### **1.5.2. Efeitos dos EDC nos Invertebrados, Peixes, Répteis e Anfíbios, Pássaros e Mamíferos**

A informação relativa aos impactos dos EDC nos organismos e respectivas populações ainda é muito limitada e restringe-se a um pequeno número de espécies, incluindo estudos ao nível dos vertebrados e invertebrados (Tyler *et al.*, 1998). Já foram contudo, registados vários tipos de efeitos em mamíferos, pássaros, répteis, peixes e moluscos.

Ao nível dos moluscos a informação é muito escassa principalmente devido à falta de informação que existe ao nível da fisiologia endócrina básica. Alguns desses estudos registaram trabalho de campo onde se verificaram fenómenos que causam o “imposex” e o “intersex”, resultando numa virilização das fêmeas (Matthiessen and Gibbs, 1998; Barroso *et al.*, 2002; Evans *et al.*, 2001). Estes efeitos foram atribuídos ao TBT (utilizado na indústria naval) e registados um pouco por todo o mundo (Tyler *et al.*, 1998).

Os primeiros efeitos registados nos peixes datam de há mais de duas décadas e foram realizados pela Thames Water Authority, que encontrou fenómenos de “intersex” ou hermafroditismo em peixes que viviam numa lagoa que recebia água residual tratada, junto ao Rio Lea (Inglaterra) (Purdom *et al.*, 1994; Sumpter, 1998; Tyler and Routledge, 1998). Foram também registados fenómenos idênticos em trutas em rios britânicos que recebiam águas residuais provenientes de ETAR (Purdom *et al.*, 1994, Jobling *et al.*, 1997). Estas descobertas sugeriram que as águas residuais provenientes de ETAR, continham químicos ou misturas de químicos, que seriam estrogénicas para os peixes (Sumpter, 1995; Sumpter e Jobling, 1995). Posteriormente foram realizados outros estudos direccionados para o estudo da estrogenicidade dos efluentes de ETAR e a sua influência e efeitos em carpas e trutas. Todos eles demonstraram que estes efluentes tinham um elevado potencial estrogénico (Purdom *et al.*, 1994). Em alguns estudos realizados por Jobling *et al.*, (1998) mostraram que 100% dos peixes macho continham ovócitos, existindo uma correlação muito forte entre estas descobertas e a proximidade destes peixes e as descargas de efluentes de ETAR.

Apesar da composição das águas residuais variar significativamente, consoante a sua origem (industrial ou doméstica) e dos próprios hábitos da população que lhe estão associados, os estudos realizados nos EUA, Alemanha e França produziram resultados muito similares (Folmar *et al.*, 1996).

Os principais estudos realizados em répteis foi efectuado em 1980, nos EUA, Florida, com crocodilos, junto ao Lago Apopka. Foi observada a diminuição da população juvenil de crocodilos para além de se terem registado elevados níveis de estradiol. Os principais EDC presentes eram o DDD, DDE e Cloro DDT. Foram também registados fenómenos de feminização de tartarugas macho no Lago Great (Fox, 2001).

Relativamente aos anfíbios, a informação ainda é mais escassa do que nos invertebrados, contudo e apesar de não se concluir com certeza que a diminuição da população de anfíbios está relacionada com a exposição aos EDC, foram já verificados vários efeitos em algumas espécies, nomeadamente em salamandras que viviam junto a uma lagoa que recebia águas residuais de uma ETAR, onde se registaram várias lesões na sua pele.

Os estudos em pássaros mostraram também uma correlação muito forte entre a exposição a EDC, nomeadamente PCB e PCDF, e patologias ao nível do sistemas reprodutor e ao nível do desenvolvimento em geral (Vos *et al.*, 2000).

Relativamente aos mamíferos já foram realizados vários estudos, nomeadamente, em panteras (EUA, exposição a PCB), em ursos pretos, polares e cinzentos (Canadá e Europa - EDC em geral) e os resultados são muito semelhantes aos registados para os outros organismos, isto é, diminuição do número de indivíduos, o que poderá estar directamente relacionado com a diminuição da capacidade reprodutiva, e registo de algumas patologias ao nível do sistema reprodutor e imunológico (Tyler *et al.*, 1998).

## **1.6. Métodos para determinação de EDC**

### **1.6.1. Ensaios “*In Vitro*”**

A maior vantagem deste tipo de ensaios é a facilidade de operacionalização, isto é, utilização de técnicas bem definidas e já universalmente aceites, contudo, são, em alguns casos, limitados e as suas respostas devem ser confirmadas e cruzadas com ensaios “*in Vivo*”.

#### **1.6.1.1. Ligação Competitiva de um Ligando (“Competitive Ligand Binding”)**

Estes ensaios baseiam-se na forma de acção dos estrogénios e xenoestrogénios que se ligam ao receptor do estrogénio (RE), isto é, a ligação ao RE provocará uma alteração da actividade biológica. Estes ensaios são de elevada fiabilidade, tendo sido mesmo já propostos para integrar os métodos utilizados e aceites pela Environmental Protection Agency (EPA).

Estes testes têm sido utilizados para identificação de actividade estrogénica de vários compostos, tendo nalguns casos sido difícil a comparação entre estudos devido à falta de procedimentos “standard” devidamente reconhecidos. No Quadro 3. mostram-se os

principais testes desenvolvidos e alguns dos compostos avaliados (adaptado de Birkett e Lester, 2003).

Quadro 3 - Alguns testes desenvolvidos e alguns dos compostos avaliados

Receptor	Composto testado
hER $\alpha$ (receptor estrogénico humano)	p- Nonilfenol
	PAH
	Organoclorinas
	PCB
hER $\beta$ (receptor estrogénico humano)	PAH
RE de peixes	Alquilfenóis
	Octilfenol
	Nonilfenol
	Fetalatos
	Clorofenóis
	PCB
RE de ratos	Whiskey
	Vinho tinto
	Vinho branco
RE de répteis	PCB

#### 1.6.1.2. Técnicas de Proliferação de Células

Esta técnica baseia-se predominantemente em derivações de células humanas e utiliza um determinado número de receptores para medição da proliferação de células induzidas devido à exposição a compostos estrogénicos.

O principal problema desta técnica é a reprodutibilidade dos estudos. EX. as células mamárias (melhores células para a compreensão dos vários mecanismos) possuem uma especificidade muito elevada ao nível dos subtipos de receptores, o que conduz a diferentes resultados.



No Quadro 4. mostram-se as principais técnicas desenvolvidas e alguns dos compostos avaliados (adaptado de Birkett e Lester, 2003).

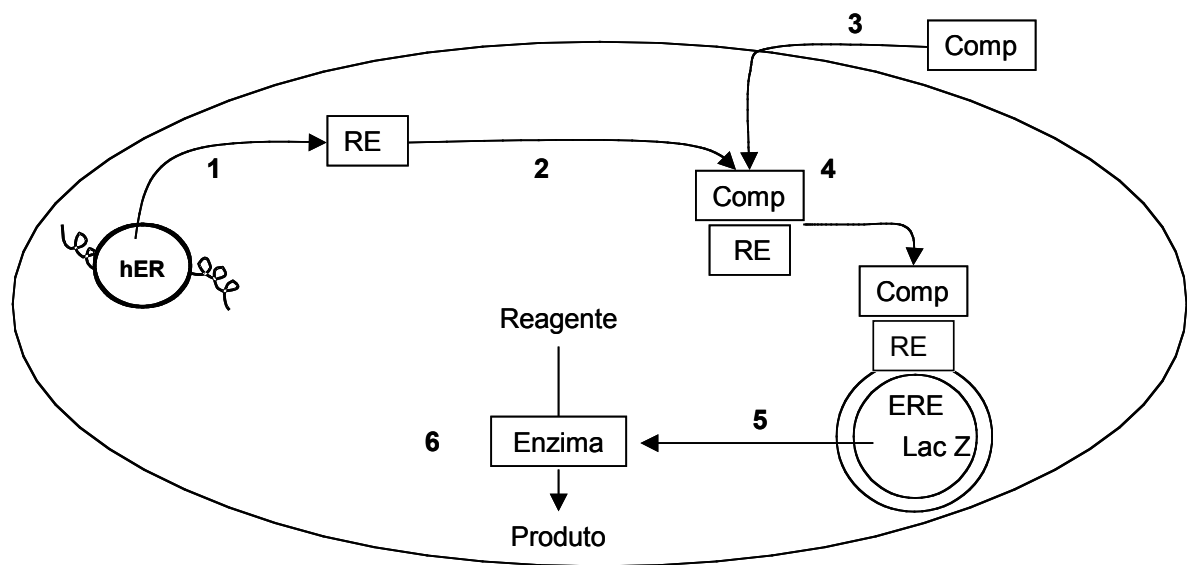
Quadro 4 - Algumas técnicas desenvolvidas e alguns dos compostos avaliados

<b>Receptor</b>	<b>Composto testado</b>
MCF-7	Alquilfenóis
	Alquilfenóis Polietoxilatos
	Nonilfenol
	Octilfenol
	Butilfenol
	Bisfenóis
	Cloro fenóis
	DDT
	PCB
	Fetalatos
	Águas residuais
	Selante dentário
ZR – 75 (Cancro da Mama Humano)	Fetalatos
	Alquilfenóis
	Alquilfenóis Polietoxilatos
	P -Nonilfenol

#### **1.6.1.3. Ensaios Recombinantes Receptor – Resposta (“Recombinant Receptor – Reporter Assays”)**

Esta técnica foi utilizada para efectuar uma primeira abordagem na monitorização, contudo a sua utilização rotineira e expedita veio a revelar-se bastante difícil. Estes testes utilizam células geneticamente modificadas.

Na Figura 4 mostra-se a resposta estrogénica num sistema de “yeast”, (adaptado de Birkett e Lester, 2003 ).



Legenda:

1. O hER é incorporado no genoma
2. O receptor estrogénico (RE) é activado pelos compostos estrogénicos (comp) que entram e se ligam à célula (3)
4. O receptor estrogénico (RE) activado liga-se ao Elemento Receptivo estrogénico (ERE)
5. Com a ligação ao ERE, inicia-se o processo de libertação de proteínas (neste caso concreto da enzima  $\beta$  - galactosidase)
6. A enzima metaboliza o reagente e há uma alteração de cor que pode ser medida através de leituras da absorvância.

Figura 4 - resposta estrogénica num sistema de “yeast” – adaptado de Birkett e Lester, 2003.

De uma forma geral as técnicas desenvolvidas que recorrem a células humanas, ou produzidas laboratorialmente, ou de outros organismos resolvem muitos dos problemas de teste de possíveis efeitos causados por determinados compostos ao Homem. Contudo, persistem alguns problemas relacionados com as diferenças existentes no metabolismo entre células *in vitro* e *in vivo* e aplicabilidade de determinados receptores a todos os organismos. (Holmes *et al.*, 1998).

### **1.6.2. Ensaios “*In Vivo*”**

Estes ensaios são utilizados para a avaliação dos impactos no sistema endócrino como um todo, e têm sido propostos para que haja um entendimento global destes efeitos. Têm sido realizados estudos multigeracionais relativos à reprodução acompanhados de estudos de toxicidade (O'Connor, *et al.*, 1998).

O ensaio “*in vivo*” mais utilizado é o ensaio uterotrófico (“rodent uterotrophic assay”) que é baseado na capacidade de químicos simularem o crescimento do útero (Shelby *et al.*, 1996 e Odum *et al.*, 1997). Um aumento no tamanho do útero em fêmeas imaturas de ratos é considerada uma ótima medida de estrogenicidade (Korach *et al.*, 1995 e Gray *et al.*, 1997).

É muito pouco provável que estes testes sejam utilizados para monitorização ambiental (ex. descargas de ETAR) porque para além de serem muito dispendiosos e demorados, a sua utilização levanta algumas questões éticas (O'Connor, *et al.*, 1998 e European Center for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (ECETOC), 1999). A sua aplicabilidade dever-se-á resumir à validação de outras técnicas e estratégias, de forma a poder testar a sua sensibilidade e reprodutibilidade.

### **1.6.3. Técnicas Físico- Químicas**

A utilização de técnicas físico-químicas permitem a monitorização da ocorrência de compostos identificados como EDC no ambiente, (água, ar, solo e sedimentos) nos organismos, nos alimentos e respectivas embalagens e durante um determinado trabalho quando as situações assim o justificam (Birkett e Lester, 2003).

#### **1.6.3.1. Técnicas Físico-químicas para determinação de EDC em águas residuais**

A determinação de EDC cuja concentração pode ser da ordem de 1 ng/l ou mesmo mais baixa, numa matriz complexa como é uma água residual representa um enorme

desafio, principalmente quando estão presentes vários outros compostos que podem interferir na determinação (Lopez de Alda, *et al.*, 2001). Esse desafio começa na amostragem dos materiais a analisar e pode ainda subdividir-se numa extracção e uma complexa preparação de amostras. Esta pré preparação pode incluir fases como: (i) purificação da amostra para determinadas amostras (“sample cleanup”) (ii) derivatização e (iii) concentração de amostras, para que finalmente possam ser quantificadas.

O método mais comum para determinação de compostos estrogénicos é através de cromatografia, gasosa (GC) ou líquida (LC), consoantes os casos. O detector que está acoplado ao sistema de GC ou LC também é extremamente importante devido às baixas concentrações envolvidas, devendo ser bastante específico e sensível. Apesar de terem sido utilizados detectores de captura electrónica, chama fotométrica e detectores de azoto - fósforo, no caso do GC e ultravioleta e fluorescência, no caso do LC, ultimamente os detectores mais utilizados são os MS (detectores de massa – espectrometria de massa), que pode ser um detector ou dois em simultâneo (MS-MS). Estes últimos (MS-MS) são considerados os detectores mais sensíveis e específicos.

Para a quantificação dos EDC através de LC-MS tem de ocorrer a ionização do composto antes de entrar no espectrómetro de massa. Para a determinação do grau de ionização é extremamente importante a interface entre o LC e o MS, sendo expectável existirem diferentes eficiências consoante o fornecedor do equipamento. As principais interfaces existentes são: (i) interface com electrospray (ESI) e (ii) ionização química à pressão atmosférica (APCI).

Na Figura 5 mostra-se a título exemplificativo, um cromatograma, obtido por LC com detector por fluorescência, relativo ao bisfenol A, 17 $\beta$ estradiol, etinilestradiol, octilfenol e nonilfenol.

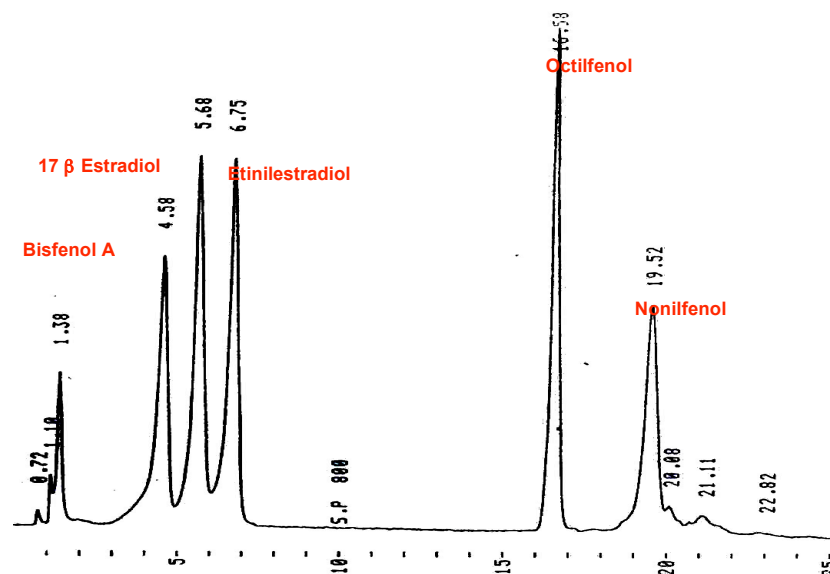


Figura 5 - Cromatograma, obtido por LC com detector por fluorescência, relativo ao bisfenol A, 17  $\beta$  estradiol, etinilestradiol, octilfenol e nonilfenol.

Como se pode verificar através da Figura 5, tanto a quantificação através de GC, como através de LC pode ser efectuada em simultâneo para vários compostos presentes na amostra. Contudo, e como já foi referido anteriormente a análise cromatografica é apenas o passo final de uma determinação química complexa que poderá envolver a extracção dos compostos de uma fase sólida ou líquida, consoante o caso, para um solvente orgânico, seguido de passos de concentração e purificação da amostra, de forma a remover compostos que poderão interferir na quantificação.

Com a inerente necessidade de desenvolver métodos e técnicas cada vez mais precisas e sensíveis, foram sendo criadas técnicas específicas para conjuntos de EDC com as mesmas características (Castillo, *et al.*, 1999).

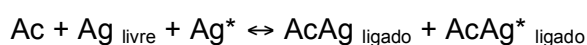
#### 1.6.4. Outras Técnicas

Alternativamente às técnicas expostas anteriormente foram desenvolvidas técnicas imuno – químicas. Estas técnicas oferecem um elevado número de vantagens, nomeadamente: (i) muito selectivas e extremamente sensíveis devido à especificidade

do anticorpo relativamente ao composto analisado, (ii) utilização de pequenos volumes de amostra, (iii) baixo custo e (iv) simplicidade de metodologias.

Contudo, os métodos imuno-químicos foram desenvolvidos apenas para algumas famílias de compostos mas ainda para poucos EDC presentes no ambiente, o que desde logo constitui uma grande limitação.

Existem duas abordagens analíticas diferentes para determinação de EDC em águas residuais: (a) “enzyme immunoassay (EIA) e (b) “radioimmunoassay (RIA). Os ensaios imuno (“Immunoassays”) são caracterizados pela seguinte reacção:



Ac – Anticorpo; Ag – Antígeno; Ag\* - Antígeno identificado

O antígeno é o composto a ser determinado e que se irá ligar ao anticorpo (proteína). O antígeno identificado está ligado a um marcador ou no caso da técnica RIA, identificado através de um isótopo radioactivo (Diaz-Ferrero *et al.*, 1997). Os anticorpos são produzidos pelos sistemas imunológicos depois da imunização e podem ser de origem policlonal ou de um meio de cultura celular.

O ensaio mais comum para determinação de contaminantes ambientais, dentro das técnicas de EIA, é o “enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA) (Meulenberg *et al.*, 1995). Esta técnica para além de ser relativamente barata, quando comparada com as restantes, é de uma utilidade extrema no que diz respeito à determinação de compostos orgânicos no ambiente e para diagnóstico clínico (Van Emon *et al.*, 1992 e Vandelaan *et al.*, 1990).

O teste ELISA, sendo uma particularidade da EIA, baseia-se numa reacção de competição entre um anticorpo monoclonal específico e o composto a analisar, onde correm dois tipos de reacção: (i) Reacção de Competição e (ii) Reacção Cromogénica.

Na Reacção de Competição o anticorpo (normalmente monoclonal) liga-se exclusivamente com o EDC (antígeno) em análise. O EDC a analisar e o conjugado (antígeno – enzima), (EDC marcado com uma enzima que ao reagir muda de cor),

devem ser previamente misturados, ocorrendo nesse momento uma reacção de competição devido ao número limitado de ligações ao anticorpo.

Na Reacção Cromogénica o excesso de conjugado, e o EDC, que não reagiu, devem ser removidos através de uma lavagem para depois ser adicionado um substrato cromogénico, de modo a desenvolver cor, quando na presença do conjugado da enzima. A quantidade deste ligado ao anticorpo determina a intensidade da cor, que por sua vez pode ser quantificada através da medição da absorvância utilizando para o efeito um leitor ELISA (ex. na Figura 6).



Figura 6 – Leitor de ELISA

Para quantificar os EDC, devem construir-se curvas de calibração (para cada EDC), também denominadas de curva de dose / resposta , através da determinação da absorvância a 450nm de padrões dos EDC's, com concentrações conhecidas. A concentração de EDC's em cada amostra é determinada através da medição da intensidade de absorvância.

Foram elaborados vários estudos para comparação da técnica de ELISA com o GC-MS-MS, onde se concluiu que a primeira requer menos volume de amostra, é mais sensível, isto é permite detectar concentrações menores de determinados compostos e, nalguns casos, sofria uma menor influência das características inerentes da matriz.

Actualmente existem várias kits a serem comercializados principalmente na área dos herbicidas (Gascon *et al.*, 1997).

Embora estas técnicas apresentem muitas vantagens possuem também muitas limitações, nomeadamente a reacção cruzada (cross-reacting), perturbações devido ao tipo de matriz e o seu desenvolvimento restringe-se a um único composto estando limitado, por isso, a uma análise multi-resíduo (Huang *et al.*, 2001).

A aplicação deste tipo de técnicas tem sido muito limitado ao nível das matrizes, isto é, o seu bom desempenho está directamente relacionado com matrizes relativamente puras (ex. rios, água subterrânea e água para consumo humano).

Nos últimos anos foram desenvolvidas inúmeras metodologias para determinação e avaliação da potencial estrogénicidade de determinados xenobióticos ou determinadas águas residuais através de biomarcadores. Um dos grandes exemplos dessa aplicação é na determinação de EDC nos peixes onde são utilizados métodos como a indução de vitelogenina (Vtg), medição dos esteroides no plasma, alterações do sistema reprodutor etc. (Diniz, 2005).



## **2. OBJECTIVOS E ESTRUTURA DA TESE**

## 2.1. Objectivos Gerais

O principal objectivo deste estudo foi avaliar o potencial estrogénico de um efluente de uma ETAR, através da aplicação de várias técnicas, isto é, para além de avaliar a estrogenicidade de um determinado efluente, comparar algumas das técnicas existentes – técnicas tradicionais (técnica físico-químicas) e técnicas bioanalíticas (kits ELISA).

A utilização de combinações de técnicas, ensaios *in vivo*, *in vitro* etc., com técnicas químicas têm sido usada em estudos de efluentes de ETAR, de forma a poder-se confirmar a estrogenicidade do efluente e quais os compostos presentes que estão a provocar essa estrogenicidade. Dessa forma, este estudo visa estudar a estrogenicidade de um efluente de origem maioritariamente urbana, contudo também com uma fracção significativa de efluentes de origem industrial. A caracterização de estudos deste tipo de efluentes (mistos – mistura de efluentes urbanos e industriais) ainda é pouco conhecida, pelo que se julga que este estudo representou um avanço a esse nível.

Outro dos grandes objectivos deste estudo foi a determinação de alguns compostos alvo ao longo da linha de tratamento da ETAR, de modo a poder avaliar qual ou quais as operações ou processos unitários com maior eficiência de remoção para cada composto.

A escolha dos compostos alvo foi criteriosa, tendo-se tentado escolher compostos consoante a sua família química (compostos de diferentes famílias) de forma a poder ter-se um estudo mais abrangente e geral.

Contudo, e uma vez que os EDC estão presentes em concentrações extremamente baixas nas ETAR foram necessárias técnicas analíticas muito sofisticadas para a sua determinação.

No presente estudo foram adoptadas várias técnicas analíticas para determinação de EDC numa ETAR previamente seleccionada localizada em Lisboa, Portugal.

Foram utilizados procedimentos analíticos associados a técnicas convencionais, como cromatografia gasosa e cromatografia líquida, acoplados a sistemas de detecção

extremamente sensíveis como sistemas de espectrometria de massa (MS) ou dos sistemas de espectrometria de massa em série (MS-MS) para a determinação dos EDC presentes nas várias etapas de tratamento da ETAR.

Alternativamente foram também utilizadas técnicas imuno-químicas (ELISA), uma vez que podem ser mais sensíveis que as anteriores e requerem volumes de amostra inferiores.

Desta forma, foi possível avaliar o potencial estrogénico do efluente da ETAR e comparar duas técnicas analíticas de determinação de EDC.

Na Figura 7 mostra-se um diagrama que resume a determinação dos EDC seleccionados

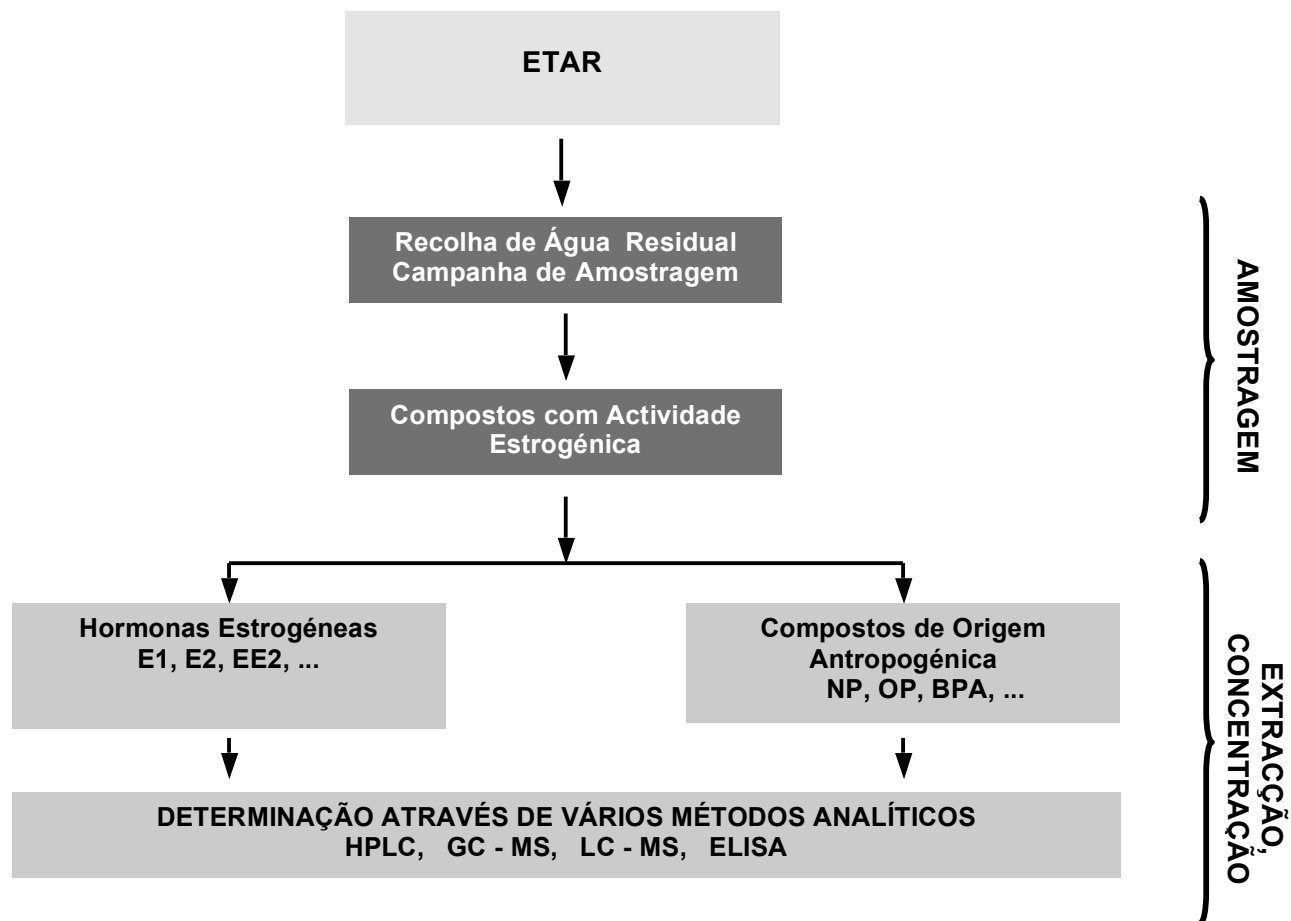


Figura 7 - Diagrama que sumariza a determinação dos EDC seleccionados

## **2.2. Estrutura da Tese**

Esta tese é dividida em cinco capítulos e dois anexos, baseados em artigos que foram publicados, ou estão em fase de publicação e, ou aceitação ou em artigos que estão em preparação para publicação.

No primeiro capítulo fez-se uma introdução que serviu de base teórica a este estudo. O segundo capítulo descreve sumariamente os principais objectivos desta tese, bem como a sua estrutura.

No terceiro capítulo descreveram-se os critérios de selecção da ETAR analisada. Este capítulo está muito relacionado com o capítulo quarto onde foram identificados e quantificados alguns EDC, nas diferentes etapas do tratamento da ETAR de Chelas, em Lisboa.

No quinto e último capítulo é constituído pela discussão geral e principais conclusões deste estudo.

São ainda apresentados dois anexos, que serviram de suporte de informação para os vários capítulos apresentados.

Assim, esta tese foi dividida nos seguintes capítulos e anexos:

### **CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO**

### **CAPÍTULO 2 – OBJECTIVOS E ESTRUTURA DA TESE**

### **CAPÍTULO 3 – SELECÇÃO DA ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUAIS (ETAR)**

### **CAPÍTULO 4 – CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS DESREGULADORES ENDÓCRINOS SELECIONADOS NUMA ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUAIS PORTUGUESA.**

**Maurício, R.**, Diniz, M., Petrovic, M., Amaral, L., Peres, I., Barceló, D., Santana, F. (2006). A Characterization of selected Endocrine Disruptor Compounds in a Portuguese Wastewater Treatment Plant. *Environmental Monitoring and Assessment*. nº. 118, pp 75 - 87

Diniz M.; **Maurício R.**; Mateus E.; Amaral L.; Peres I.; Castro L.; Santana F. (2001). Avaliação da remoção do nonilfenol numa estação de tratamento de Águas residuais urbanas. Efeitos da Exposição em carpas (*CYPRINUS CARPIO*). Publicado nos Proceedings do 2º Encontro Nacional de Entidades Gestoras de Água e Saneamento (ENEG), Lisboa 9 – 11 October 2001.

**Maurício, R.**, Diniz, M., Petrovic, M., Amaral, L. Peres, I., Santana, F., Barceló, D. (2004). Avaliação do Potencial Estrogénico e Caracterização Físico-Química da ETAR de Chelas (Lisboa). Publicado nos Proceedings da 8ª Conferência Nacional de Ambiente, 27-29 de Outubro, Lisboa.

**R. Maurício**, M. Diniz, E. Mateus, L. Amaral, F. Santana (2001). Avaliação da remoção de compostos disruptores endócrinos presentes nas águas residuais urbanas. Publicado nos Proceedings da Conferência Ibérica de Protecção Ambiental, Instituto Piaget – Viseu, 12 a 14 de Julho (Portugal).

**Maurício, R.**, Diniz, M., Amaral, L., Peres, I., Santana, F. (2003). Screening Endocrine Disruptors Compounds in a Portuguese Wastewater Treatment Plant using Enzyme Linked Immunoassay (ELISA). Panel Communication Presented at the 6th National Conference on Endocrine Disruptors, 12nd SESA Technical Jornada, November (26 – 28) Elche (Spain).

Mário S. Diniz, **Rita Maurício**, Mira Petrovic, López de Alda , Leonor Amaral, Isabel Peres , Jean C. Pihan, Damiá Barceló, and Fernando Santana. (2006) Assessing the Estrogenic Potency in a Portuguese Wastewater Treatment Plant - A Multi-Level Approach (submetido à revista Environmental Science and Technology)

## **CAPÍTULO 5 – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES**

## REFERÊNCIAS

- Ahel, M., Ginger, W., and Koch, (1994). M. Behaviour of alkylphenol ethoxylates surfactants in the aquatic environment. 1. Occurrence and transformation in sewage treatment. *Water Research*, 28, 1131.
- Arukwe, A., Thibaut, R., Ingebrigsten, K., Celius, T., Goksøyr, A., Cravedi, J-P. (2000). In vivo and in vitro metabolism and organ distribution of nonylphenol in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquatic Toxicology*, 49 (249), 289-304.
- Arukwe, A. (2001). Cellular and Molecular Responses to Endocrine-Modulators and the Impact on Fish Reproduction. *Marine Pollution Bulletin*, vol. 42, nº8, pp. 643-655.
- Ashby, J., Lefevre, P.A. (1997). The weanling male rat as an assay for endocrine disruption: preliminary observations. *Regul. Toxicological Pharmacology*, 26, 330-337.
- Ashfield, A.L., Pottinger, T.G., and Sumpter, J.P. (1998). Exposure of female juvenile rainbow trout to alkylphenolic compounds results in modifications to growth and ovosomatic index. *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 17, Nº3, pp. 679-686.
- Baker, M.E. (2001). At the Cutting Edge. Hydroxysteroid dehydrogenases: ancient and modern regulators of adrenal and sex steroid action. *Molecular and Cellular Endocrinology* 175, 1 – 4.
- Barroso, C.M., Moreira, M.H., Bebianno, M.J., (2002). Imposed, female sterility and organotin contamination of the prosobranch *Nassarius reticulatus* from the Portuguese coast. *Marine Ecology Progressive Series* 230, 127-135.
- Birkett, J.W. (2003). Scope of the problem. In *Endocrine Disruptors in Wastewater and Sludge Treatment Processes*. Ed. J.W. Birkett and J. N. Lester. IWA Publishing and Lewis Publishers. CRC Press LLC. Chpt 1, Pp. 1 - 34.
- Birkett, J.W. e Lester, J. (2003). *Endocrine Disruptors in Wastewater and sludge treatment processes*. Chapter 3. Methods for the determination of endocrine disruptors. 1<sup>st</sup> ed. Lewis publishers. IWA.

Brekine, D. (1997). Environmental Endocrine Disruptors: Overview Of The Publications And The Main Questions, Globe, Brussels.

Carson, R., (1962). Silent Spring, Houghton Mifflin: Boston.

Castillo, M., Alonso, M.C., Riu, J., and Barcelo, D., (1999). Identification of polar, ionic and highly water soluble organic pollutants in untreated industrial wastewater, Environmental Science Technology., 33, 1300.

Colborn, T., vom Saal, F.S., Soto, A.M. (1993). Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. Environmental Health Perspectives, 1993;101:378-384.

Davis, M.H, Cleveland, C., Sharar, M. (1999). Endocrine Disruptors in Waste Water: Is there cause for Concern? Prepublication copy for presentation at the Water Environment Federation, 72nd Annual Exhibition & Technical Conference, New Orleans, USA, Pp. 12.

Diaz-Ferrero, J., Rodriguez-Larena, M.C., Comellas, L., and Jimenez, B. (1997). Bioanalytical methods applied to endocrine disrupting polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans: A Review, Trac-Trends. Analytical Chemistry, 16, 563.

Diniz, M. (2005). Contribution to the study of endocrine disruptor compounds in cyprinids: Assessment of effects on fish exposed to final effluent of urban wastewater treatment. Tese de Doutorado - FCT / UNL.

European Center for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals. Screening and Testing Methods for Recommendations and a Proposed Alternative Approach Document No. 39, 1999.

European Commission (1996). European Workshop on the Impact of Endocrine Disruptors on Human Health and Wildlife. Report of the Proceedings 2-4 December 1996, Weybridge, UK, Report EUR 17549, 125pp.



Evans, S.M., Bech, M., Hawkins, S.T., Smith, R., Stewart, A. (2001). Imposex in populations of dogwhelks *Thais* spp. In relation to shipping intensity and mariculture activity in East Asia. *Invertebr. Reproductive Development*, 39, 231-237.

Folmar, L.C., Denslow, N.C., Rao, V., Chow, M., Crain, D.A., Enblom, J., Marcino, J., Guillette, L.J. Jr. (1996). Vitellogenin induction and reduced serum testosterone in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environment Health Perspectives* 104:1096-1101.

Folmar, L.C., Denslow, N.D., Kroll, K., Orlando, E.F., Enblom, J., Marcino, J., Metcalfe, C., Guillette, L.J. (2001). Altered serum sex steroids and vitellogenin induction in walleye (*Stizostedion vitreum*) collected near a metropolitan sewage treatment plant. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 40 (3): 392-398.

Foster, W. (1998). Endocrine Disruptors & Development of the Reproductive System in the Fetus and Children: Is there Cause for Concern? *Canadian Journal of Public Health*. 89 (Suppl 1): S 37 - 41.

Fox, G.A. (2001). Wildlife as sentinels of human health effects in the Great Lakes-St. Lawrence basin. *Environmental Health Perspectives*, 109 (Suppl. 6), 853–861.

Gascon, J., Oubina, A., and Barceló., D. (1997). Detection of endocrine-disrupting pesticides by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): application to atrazine, *Trac-trends Analytical Chemistry*. 16, 554.

Gray, L.E., Kelce, W.R., Wiese, T., Tyl, R., Gaido, K., Cook J., Klinefelter, G., Desaulniers, D., Wilson, E., Zacharewski, T., Waller, C., Foster, P., Laskey, J., Reel, J., Giesy, J., Laws, S., McLachlan, J., Breslin, W., Cooper, R., DiGiulio, R., Johnson, R., Purdy, R., Michaich, E., Safe, S., Sonnenschein, C., Welshons, W., Miller, R., McMaster, S., and Colborn, T., (1997). Endocrine screening methods workshop report: detection of estrogenic and androgenic hormonal and antihormonal activity for chemicals that act via receptor or steroidogenic enzyme mechanisms. *Reproduction Toxicology*, 11,719.

Hamer, G. (1997). Microbial consortia for multiple pollutant biodegradation, *Pure Applied Chemistry*, 69 (11), 2343-2356.

Harries, J.E., Sheahan, D.A., Jobling, S., Matthiessen, P., Neall, P., Routledge, E.J., Rycroft R., Sumpter, J.P., and Tylor, T. (1996). A Survey of Estrogenic Activity in United Kingdom Inland Waters. *Environmental Toxicology and Chemistry*: Vol. 15, No. 11, pp. 1993 – 2002.

Holmes, P., Humphrey, C., and Scullion, M. ( 1998). Appraisal of test methods for sex-hormone disrupting chemicals capable of affecting the reproductive process, <http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm>.

Huang, C.-H., Sedlak, D.L. (2001). Analysis of estrogenic hormones in municipal wastewater effluent and surface water using enzyme-linked immunosorbent assay and gas chromatography / tandem mass spectrometry. *Environmental Toxicology Chemistry*, 20,133.

IEH, Institute for Environment and Health (1995). *Environmental oestrogens: consequences to human health and wildlife*. Leicester, UK: Institute for Environment and Health, pp.107.

Ishibashi, H., Tachibana, K., Tsuchimoto, M., Soyano, K., Ishibashi, Y., Nagae, M., Kohra, S., Takao, Y., Tominaga, N., Arizono, K. (2001). In vivo testing system for determining the estrogenic activity of endocrine-disrupting chemicals (EDCs) in goldfish (*Carassius auratus*). *Journal of Health Science* 47 (2): 213-218.

Jounay, J-M. (2000). Introduction to Meeting on Endocrine Disruptors. *Ecotoxicology*, 9, 19-20.

Jobling, S., Sheahan, D., Osborne, J.A., Matthiessen, P., Sumpter, J.P., (1996). Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environmental Toxicology Chemistry*, 15 (2), 194 – 202.

Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C.R., Brighty, G., Sumpter, J.P. (1998). Widespread sexual disruption in wild fish. *Environmental Science and Technology*, vol. 32, 17, pp. 2498-2506.

Kendall, R.J., Dickerson, R.L., Giesy, J.P., Suk, W.A. (1998). Principles and processes for evaluating endocrine disruption in wildlife. SETAC technical publication. Pensacola, Florida: SETAC Press, pp.:491.

Kinnberg, K., and Toft, G. (2003). Effects of estrogenic and antiandrogenic compounds on the testis structure of the adult guppy (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54, 16–24.

Kilburn, K.H., Warsaw, R.H. & Shields, M.G. (1989) Neurobehavioral dysfunction in firemen exposed to polychlorinated biphenyls (PCBs): Possible improvement after detoxification. *Archives of Environmental Health*, 44:345-350.

Kloas, W., Lutz, I., Einspanier, R. (1999). Amphibians as a model to study endocrine disruptors: II. Estrogenic activity of environmental chemicals in vitro and in vivo. *Science of the Total Environment*, vol. 225, no. 1-2, pp. 59-68.

Koger, C.S., Teh, S.J., Hinton, D.E. (2000). Determining the sensitive developmental stages of intersex induction in medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17 $\beta$ -estradiol or testosterone. *Marine Environmental Research*, 50, 201-206.

Korach, K.S. and MacLachlan, J.A. (1995). Techniques for detection of estrogenicity, *Environmental Health Perspectives*, 103, 5

Lester, J. N. and Edge, D. (2000). Sewage and sewage sludge treatment, in *Pollution Causes, Effects and Control*, 4<sup>th</sup> ed., Harrison, R.M., Ed., The royal Society of Chemistry, Cambridge.

Lindholm, C., Pedersen, S.N., Bjerregaard, P. (2001). Uptake, metabolism and excretion of bisphenol A in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 55 (1-2): 75-84.

Lopez de Alda, M.J. and Barceló, D. (2001). Review of analytical methods for the determination of estrogens and progestogens in waste water, *Fresenius Journal Analytical Chemistry*, 371, 437.

Maguire, R.J. (1999). Review of the persistence of nonylphenol and ethoxylates in aquatic environments. *Water Quality Research Journal of Canada*. 34 (1), 37-78.

Matthiessen, P., Sumpter, J.P. (1998). Effects of estrogenic substances in the aquatic environment. In: Braunbeck T, Hinton DE, Streit B, editors. Fish ecotoxicology. Switzerland: Birkhauser Verlag, Basel, 319-335.

Matthiessen, P., Gibbs, P.E., (1998). Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in molluscs. *Environmental Toxicology Chemistry* 17, 37-43.

Meulenberg, E.P., Mulder, W.H., and Stoks, P.G. (1995). Immunoassays for pesticides, *Environmental Science Technology*, 29, 553.

Morris, S.L. and Lester, J.N. (1994). Behaviour and fate of polychlorinated biphenyls in a pilot wastewater treatment plant, *Water Research*, 28, 1553.

Nichols, K.M., Snyder, E.M., Snyder, A., Pierens, S.L., Miles-Richardson, S.R. And Giesy, J.P. (2001). Effects of nonylphenol ethoxylate on reproductive output and bioindicators of environmental estrogen exposure in fathead minnows, *Pimephales promelas*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol.20,Nº3, 510-522.

NRC, (1993). Pesticides in the diets of infants and children, National Research Council, National Academy Press, Washington DC.

O'Connor, J.C. Frame, S.R. Biegel, L.B., Cook, J.C., and Davis, L.G. ( 1998). Sensitivity of a tier I screening battery compared to an in utero exposure for detecting the estrogen receptor agonist 17 beta-estradiol. *Toxicology Science*, 44, 169.

Odum, J., Lefevre, P.A., Tittensor, S., Paton, D., Routledge, E.J., Besresford, N.A., Sumpter, J.P., and Ashby, J.. (1997). The rodent uterotrophic assay: critical protocol features, studies with nonil phenols, and comparison with a yeast estrogenicity assay, *Regul. Toxicology Pharmacol.* 25, 176.

Purdom, C.E., Hardimon, P.A., Bye, V.J., Enu, N.C., Tyler, C.R. and Sumpter, J.P. (1994). Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chemical Ecology*, 8: 275-285.

Rogers, H. R. (1996). Sources, behaviour and fate of organic contaminants during sewage treatment and in sewage sludges. *Science Total Environment*, 185, 3.

Schwaiger, J., Spieser, O.H., Bauer, C., Ferling, H., Mallow, U., Kalbfus, W., Negele, R.D. (2000). Chronic toxicity of nonylphenol and ethinylestradiol: haematological and histopathological effects in juvenile Common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquatic Toxicology*, 51, 69-78.

Shelby., M.D., Newbold, R.R., Tully, D.B., Chae, K., and Davis, V.L. (1996). Assessing environmental chemicals for estrogenicity using a combination of *in vitro* and *in vivo* assays, *Environmental Health Perspectives*.104, 1296,

Solé, M., Porte, C., Barceló, D. (2001). Analysis of the estrogenic activity of sewage treatment works and receiving waters using vitellogenin induction in fish as a biomarker. *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 20, no. 9, 518-525.

Sumpter, J.P. and Jobling, S. (1995). Vitellogenesis as a Biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health. Perspectives*, 103 (Suppl. 7): 173-178.

Sumpter, J.P. (1995). Feminized responses in fish to environmental estrogens. *Toxicology letters* 82/83, 737 – 742.

Sumpter, J.P. (1997). Environmental control of fish reproduction: A different perspective. *Fish Physiology and Biochemistry*, vol. 17, no. 1-6, pp. 25-31.

Sumpter, J.P. (1998). Xenoendocrine disrupters - environmental impacts *Toxicology Letters* 102 - 103, 337-342.

Tattersfield, L., Matthiessen, P., Campbell, P., Grandy, N., Lange, R. editors. SETAC-Europe/OECD/REC Expert workshop on endocrine modulators and wildlife: assessment and testing. EMWAT. Veldhoven, The Netherlands, 10] 13 April 1997. ISBN 90-5607-010-X. Brussels: Society of Environmental Toxicology and Chemistry-Europe, 1997:126.

Toppari, J., Larsen, J.C., Christiansen, P. (1995). Male reproductive health and environmental chemicals with estrogenic effects. Copenhagen: Danish Environmental Protection Agency. Miljøprojekt no. 290,166.

Tyler, C.R., Jobling, S., and Sumpter, J.P. (1998). Endocrine disruption in wildlife: A critical review of the evidence. *Critical Reviews in Toxicology*, 28 (4), 319-361.

Tyler, C.R., and Routledge, E.J. (1998). Oestrogenic effects in fish in English rivers with evidence of their causation. *Pure and Applied Chemistry*, 70 (9): 1795-1804.

Tsuda, T., Suga, K., Kaneda, E., Ohsuga, M. (2000). Determination of 4-nonylphenol monoethoxylate, Nonylphenol diethoxylate and other alkylphenols in fish and shellfish by high-performance liquid Chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 746, 305-309.

UCB, (1997). European Allergy White Paper, UCB Institute of Allergy, Brussels.

Vandelaan, M., Stacker, L., Warkins, B., and Roberts, R. (1990). Immunoassays for Monitoring Human Exposure to Toxic Chemicals in Food and the Environment, American Chemical Society, Washington, DC, 1990

Van Emon, J. M., and Lopezavila, V. (1992). Immunochemical Methods for Environmental Analysis. *Analitical Chemistry*. 64, A79.

Vos, J.G., Dybing E., Greim, H.A., Ladefoged, O., Lambré, C., Tarazona, J.V., Brandt, I., and Vethaak, A.D. (2000). Health Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals on Wildlife, with Special Reference to the European Situation. *Critical Reviews in Toxicology*, 30 (1),71-133.

Wallace, R.A., Boyle, S.M., Grier, H.J., Selman, K. and Petrino, T.R. (1993). Preliminary Observations on oocyte maturation and other aspects of reproductive biology in female snook, *Centropomus undecimalis*. *Aquaculture*, 116, 257 – 73.

### **3. SELECÇÃO DA ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUAIS (ETAR)**

### 3. SELECÇÃO DA ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUAIS (ETAR)

#### 3.1. Descrição da Estação de Tratamento de Águas Residuais (ETAR) de Chelas, Lisboa

A ETAR de Chelas (Figura 9) localiza-se na zona Este da cidade de Lisboa (Portugal) e descarrega o seu efluente no estuário do Rio Tejo. Esta ETAR faz parte de um conjunto de três ETAR que constituem parte de sistema do tratamento de águas residuais de Lisboa.

O sub-sistema de Chelas é constituído, para além da ETAR, por sete estações elevatórias, que conduzem o efluente desde a Calçada do Grilo (Xabregas) e Alfama / Santa Apolónia, até à ETAR em Chelas, e ainda por um interceptor.

Na Figura 8 mostra-se a linha de tratamento da ETAR de Chelas e os vários pontos de amostragem, que serviram de base a este estudo.

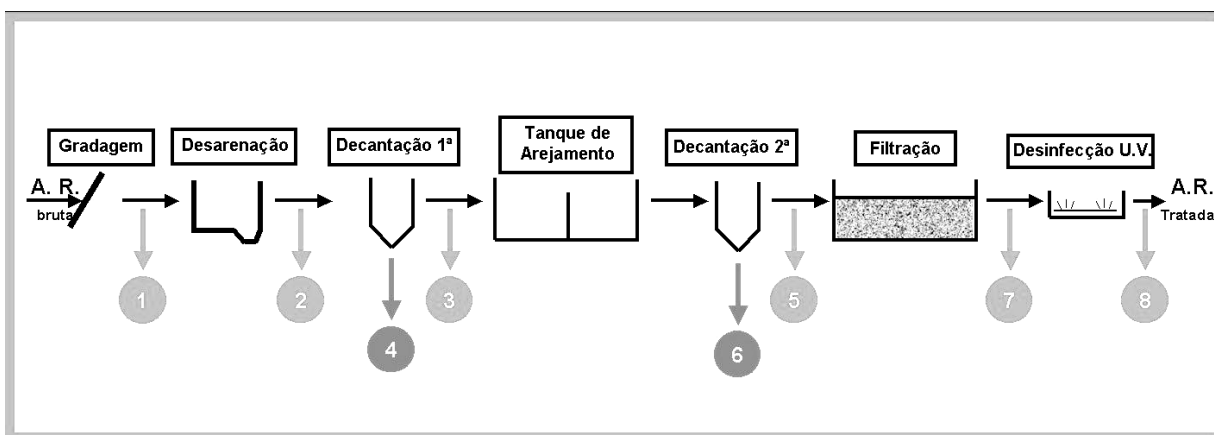


Figura 8 - Linha de tratamento da ETAR de Chelas e os vários pontos de amostragem

Como se pode verificar através da Figura 9, a ETAR de Chelas, para além de possuir tratamento secundário, possui também tratamento terciário, isto é existe remoção de nutrientes (remoção de azoto) e o efluente final é desinfectado ( U.V.).



### 3.2. Dados de Funcionamento

De acordo com a informação fornecida pela entidade gestora na ETAR de Chelas (SIMTEJO – EMARLIS), a ETAR foi dimensionada para tratar 52 500 m<sup>3</sup>/dia, o que corresponde aproximadamente a 211 000 habitantes equivalentes.

No Quadro 5 mostram-se os principais parâmetros de funcionamento da ETAR de Chelas.

Quadro 5 - Principais parâmetros de funcionamento da ETAR de Chelas.

<b>Parâmetros físico-químicos</b>	<b>Concentrações médias</b>	<b>Efluente tratado</b>
CBO <sub>5</sub> (mgO <sub>2</sub> /L)	280	25
CQO (mgO <sub>2</sub> /L)	516	125
SST (mg/L)	308	35
N Total (mg/L)	50	7
P Total (mg/L)	13	10
<b>Caudal médio (m<sup>3</sup>/dia)</b>	<b>49.000</b>	

O efluente depois de tratado é descarregado no estuário do Tejo (Figura 10), onde ainda existe pesca artesanal de peixes e moluscos e as lamas resultantes do tratamento são utilizadas na agricultura como fertilizante.



Figura 9 – Localização da ETAR

A ETAR de Chelas foi escolhida porque para além de ser constituída por vários processos de tratamento (preliminar, primário, secundário e terciário), recebe grandes volumes de água residual doméstica e também industrial. Nas figuras seguintes mostram-se algumas imagens da ETAR de Chelas (Figuras 10, 11, 12 e 13)

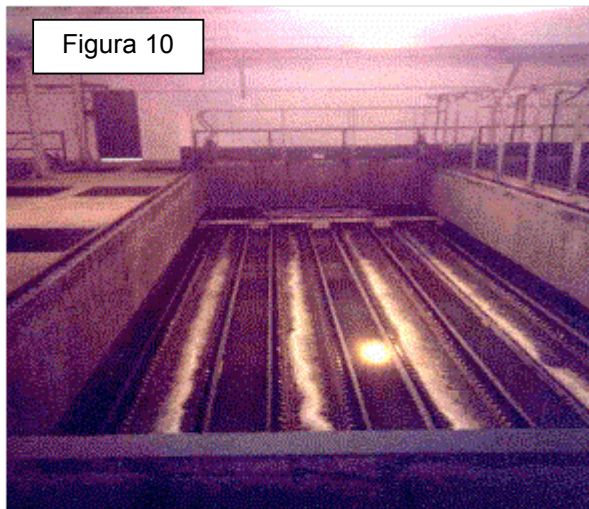


Figura 10

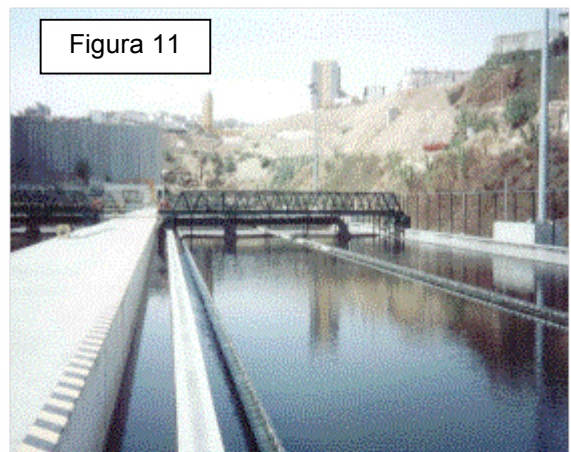


Figura 11

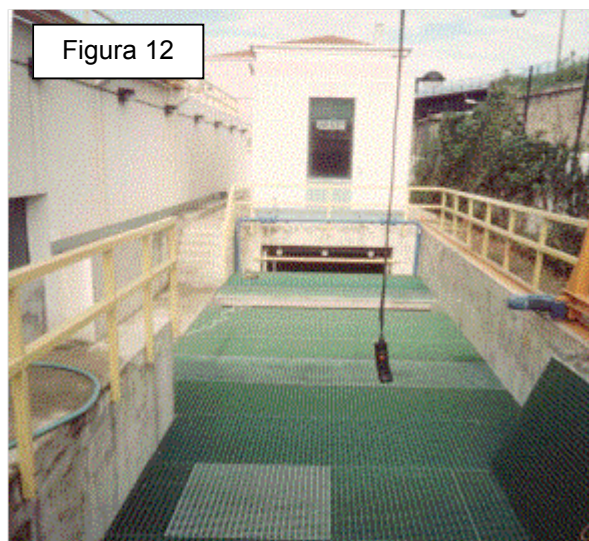


Figura 12

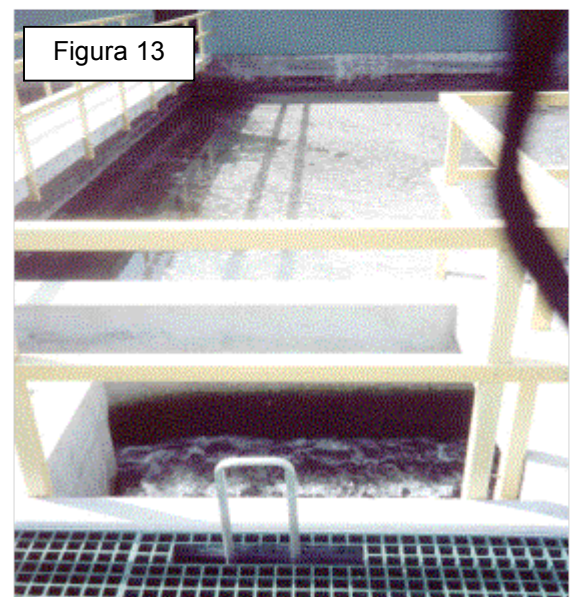


Figura 13

Figuras 10, 11, 12 e 13 – Várias Imagens da ETAR:

Figura 10 – Decantador primário; Figura 11 – Decantador secundário; Figura 12 – Sistema de desinfecção por U.V.; Figura 13 - Filtro

**4 – CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS DESREGULADORES ENDÓCRINOS  
SELECCIONADOS NUMA ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUAIS  
PORTUGUESA. COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS. EFEITOS DE EDC EM  
PEIXES**

#### **4.1. A CHARACTERIZATION OF SELECTED ENDOCRINE DISRUPTOR COMPOUNDS IN A PORTUGUESE WASTEWATER TREATMENT PLANT**

**A CHARACTERIZATION OF SELECTED ENDOCRINE DISRUPTOR COMPOUNDS  
IN A PORTUGUESE WASTEWATER TREATMENT PLANT**

**R. MAURÍCIO<sup>1\*</sup>, M. DINIZ<sup>1</sup>, M. PETROVIC<sup>2</sup>, L. AMARAL<sup>1</sup>, I. PERES<sup>1</sup>, D. BARCELÓ<sup>2</sup>  
and F. SANTANA<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Universidade Nova de Lisboa – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Dep. de Ciências e Engenharia do Ambiente, Quinta da Torre – 2825 Monte da Caparica, Portugal;* <sup>2</sup>*Department of Environmental Chemistry-IIQAB-CSIC, c/Jordi Girona, 18-26, 08034 Barcelona, Spain*

(\*author for correspondence, e-mail: rmr@fct.unl.pt)

(Received 11 March 2005; accepted 6 July 2005)

**ABSTRACT**

Anthropogenic compounds that are able to disrupt the endocrine system of wildlife species are a major cause for concern and have led to a demand for new screening methods. The identification and quantification of endocrine disruptor compounds at wastewater treatment plant is of major interest to assess the endocrine activity of wastewater treatment plant discharges into the environment. This study consists of a preliminary survey of concentrations of previously selected endocrine disruptor compounds, undertaken to establish environmental concentrations and to support a biological program assay exposing freshwater fish to them. Selected endocrine disrupting chemicals (APEs, Bisphenol A and 17  $\beta$ -estradiol) were measured in samples from a wastewater treatment plant located in Lisbon (Portugal), using recent commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits and also LC-MS/MS. The results

show that the wastewater treatment plant treatment process is efficient on the removal of target endocrine disruptor compounds. However, environmentally significant concentrations are still present in the treated effluent. The results also show that enzyme-linked immunosorbent assay kit is suitable for routine analysis of the selected compounds. The results are also useful since the wastewater treatment plant is located in a Mediterranean region, which results in an effluent with its own characteristics.

**Key words:** ELISA, endocrine disruptor compounds, environmental, LC-MS-MS, wastewater

## 1. INTRODUCTION

In the last decade there has been growing concern about a group of chemical compounds with endocrine activity which are present in the aquatic environment and can have adverse effects on reproduction in humans and wildlife species (Korner *et al.*, 1998). Many reported effects have been related to several classes of chemical compounds that are present in wastewater effluent, such as pesticides, aromatic compounds, alkylphenols, phytoestrogens and natural estrogens.

The non-ionic surfactants alkylphenol ethoxylates (APEOs) have been widely used in many domestic and commercial applications (Tsuda *et al.*, 2000) and also as emulsifiers in domestic and industrial cleaning agents (Nichols, *et al.*, 2001). During wastewater treatment, APEOs undergo successive biodegradation into persistent metabolic products more toxic than the parent compound, such as alkylphenols, and are ultimately discharged to the aquatic environment. However, the estrogenicity of these compounds is less potent than that of endogenous 17 $\beta$ -estradiol and thus only

high concentrations are liable to make a significant contribution to effluent estrogenicity (Sumpter, 1995).

Natural estrogens such as 17 $\beta$ -estradiol are known to be present in certain wastewater treatment plants as a result of human waste, registering levels considered sufficient to induce estrogenic responses (Lopéz de Alda and Barceló, 2001). Synthetic estrogens (e.g. ethynylestradiol) used in contraceptive formulations and for the treatment of hormonal conditions are excreted in the urine of mammals and enter the aquatic environment via wastewater treatment plant effluents, reaching sufficient concentrations (normally in the ng/l range) to trigger estrogenic responses (Petrovic *et al.*, 2001).

Bisphenol A is widely used in households and the plastics industry, as an intermediate in the production of epoxy resins and polycarbonate plastics. It is also used in small quantities in the manufacture of thermal paper and in food and beverage can linings), dental resin composites and sealants. BPA is expected to be present in raw sewage and WWTPs and concentrated in sewage sludge. It is also considered a chemical with weak estrogenic activity, causing adverse effects on the reproductive health and fecundity of humans and wildlife (Furhacker, 2000).

Therefore the identification and quantification of these EDCs is of major importance. Additionally, it must be noted that urban wastewater effluents are usually a very complex mixture of compounds and only a small part of them have been identified (Matsui *et al.*, 2000). However, the traditional analytical methods (e.g. GC-MS, LC-MS-MS), HPLC) are difficult, expensive and time-consuming and demand the development of specific procedures to measure these compounds in complex environmental samples. Furthermore, large sample volumes are required, besides extensive clean-up procedures to achieve sample purification. Thus, there is a strong



need for fast, simple and cost-effective methods for quantitative analysis of EDCs, such as ELISA (Goda *et al.*, 2000).

The main objectives of this study were to screen certain EDCs (APEs, BPA and 17 $\beta$ -estradiol) in a representative Portuguese WWTP, with the aid of two different analytical methods (ELISA and LC-MS-MS), and evaluate the estrogenic potential of the treated effluent discharged into the River Tagus estuary. The EDCs were selected on the basis of their known estrogenic potential, which has already been demonstrated in several studies (Routledge *et al.*, 1998; Arukwe, 2001d; Jobling *et al.*, 2003).

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1. WWTP selection – Chelas (Lisbon)**

The selection of the WWTP (Figure 1) as a case study was based essentially on the representative nature of its effluent, as it receives both domestic and industrial wastewater, and also on the existence of a complete treatment process (tertiary treatment) with partial reuse of treated effluent. The WWTP is also located in a Mediterranean region, which results in an effluent with its own characteristics.

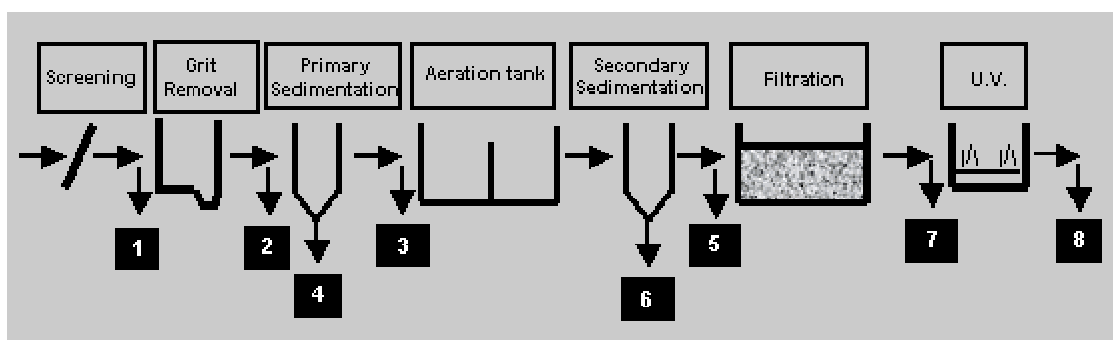


Figure 1: Diagram of the WWTP treatment steps and sampling points

The WWTP was designed to treat a mean flow of 53,000 m<sup>3</sup> per day, which corresponds to a population of approximately 211,000 equivalent inhabitants. The WWTP removes nutrients (nitrogen and phosphorus) and disinfects the final effluent before it is discharged into the River Tagus estuary. Table 1 shows the technical data from the WWTP for the period of the experiment.

Table I: Technical data from Chelas WWTP.

Physico - chemical parameters	Mean Concentrations	Treated effluent
BOD (mgO <sub>2</sub> /L)	280.0	25.0
COD (mgO <sub>2</sub> /L)	516.0	125.0
TSS (mg/L)	308.0	35.0
Total N (mg/L)	50.0	7.5
Total P (mg/L)	13.0	10.0
<b>Mean Flow (m<sup>3</sup>/day)</b>	<b>49 000</b>	

BOD: Biochemical Oxygen Demand; COD: Chemical Oxygen Demand TSS: Total Suspended Solids; Total N: Total Nitrogen; Total P: Total Phosphorus

## 2.2. Selection of chemical compounds

To perform the screening a target-group of chemical compounds was chosen (Figure 2): alkylphenol ethoxylates (APEOs), bisphenol A (BPA) and 17  $\beta$ -estradiol.

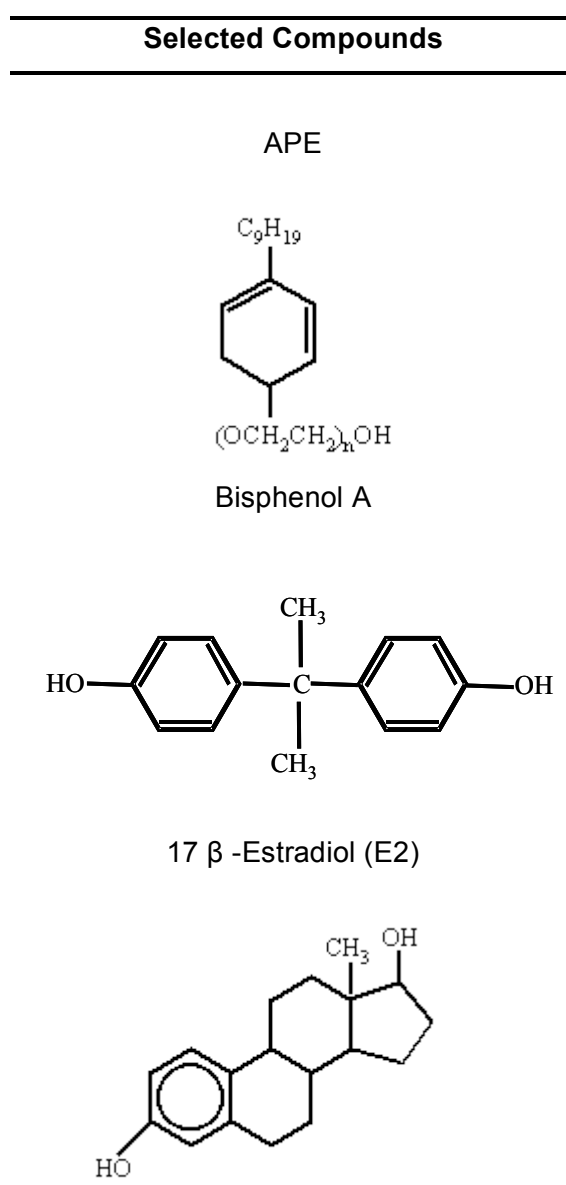


Figure 2: Chemical structure of selected compounds.

### **2.3. Sample collection**

Composite samples were collected in amber glass bottles, at 4 hourly intervals over a 24-hour period, at different sampling points of the WWTP. Each point is representative of a treatment step of the working station. The aim was to evaluate the efficiency of the unit's operations in removing previously selected compounds. Other physical and chemical parameters were also measured (pH, temperature, dissolved oxygen, TSS, VSS, COD and BOD) to gain a better understanding of the effluent quality in the sampling period and, thus, the plant's performance.

### **2.4. Wastewater Sample Pre-treatment and Extraction**

The procedures for sample pre-treatment and extraction for the ELISA and LC-MS/MS analyses followed Takeda Kits instructions and also Petrovic *et al.* (2002).

Wastewater samples (300 ml) were filtered in a glass-fibre filter with a one-micrometer pore size (Macherey – Nagel, Germany) and acidified with 1M acetic acid buffer (pH 5). The EDCs were extracted using OASIS HLB 3cc solid phase extraction (SPE) columns (Waters). Prior to extraction, the columns were conditioned with methanol and water. The EDCs were eluted with 2 x 5ml of dichloromethane (BPA and 17 $\beta$ -estradiol) or methanol (APEs), depending on the EDCs for analysis, and then evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen and reconstituted with 10% methanol to a final volume of 2 ml (sample extracts).

## **2.5. Sludge Sample Pre-treatment and Extraction**

Collection of primary and secondary sludges was performed using pre-cleaned amber glass bottles. The suspension was centrifuged at 4500 rpm for 10 min.

The solid phase was sonicated for 20 min with 20 ml of dichloromethane-methanol (7:3, v/v). The extract was separated by centrifugation at 4000 rpm for 5 min. The extraction was repeated twice with fresh solvent mixture. Extracts were pooled and concentrated to an approximate volume of 1 ml under a gentle stream of nitrogen.

## **2.6. Enzyme Linked Immuno Assay (ELISA).**

The ELISA technique was performed according to the protocols developed by Takeda Chemical Industries (Japan). Standards for EDCs were provided with Takeda Kits.

The ELISA test is based on a competitive reaction between a specific monoclonal antibody and the analysed compound. Briefly, the EDCs derived from samples and an antigen-enzyme conjugate, i.e. EDCs labelled with a colouring enzyme, are premixed and added into each microplate well for a competitive assay, vying for a limited number of antibody binding sites. When the EDC concentration is higher than that of the enzyme conjugate, the EDCs will predominantly bind the antibody and vice versa.

Unbound APE and excess antigen-enzyme conjugates are washed out. Then, the chromogenic substrate is added to develop colour in conjunction with the conjugate's enzyme. The amount of antigen-enzyme conjugate remaining with the antibody will determine colour intensity. Higher APE concentration in the sample, for example, leads

to less antigen-enzyme conjugate in a microplate well, generating a lighter colour, i.e. lower absorbance.

The standard curve, a dose-response curve from known concentrations of standard EDCs (Takeda Kits Standards), is determined from the absorbance at 450nm. The upper and lower quantification limits are shown in Table 2. The EDC concentration in each sample is accurately calculated from the response intensity of the absorbance. The results of the EDCs were determined in sample extracts and then calculated to the total sample volume.

Standard solutions were prepared according to Takeda protocol instructions just before the test was performed.

Table II - ELISA detection limits

Compound	Lower Limit (µg/L)	Upper Limit (µg/L)
APE	20.0	1,000
Bisphenol A	5.0	500
17 β -Estradiol (E2)	0.05	1.0

## **2.7. Liquid Chromatography (LC) - Mass Spectrometry (MS) - Mass Spectrometry (MS)**

All solvents (water, acetonitrile, methanol and dichloromethane) were HPLC grade and were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Analytical grade acetic acid and sodium acetate were from Panreac (Barcelona, Spain).

The individual polyethoxylated surfactants nonylphenol polyethoxylates (NPnEO) and octylphenol polyethoxylates (OPnEO), corresponding to a mixture with an average number of ethoxy groups (n) were from Kao Corporation (Barcelona, Spain). The

standard of octylphenol ethoxylate (OPEO) contained oligomers with an average of 9 ethoxy units, while standard of NPEOs contained chain isomers and oligomers with an average of 10 ethoxy units. Additionally, in the case of partially degraded samples (e.g. STP effluents) mixture of monoethoxy and diethoxy nonylphenols (49:51, w/w) and mixture of NPEOs with an average of 4 ethoxy units were used for calibration. High purity (98%) 4-tert-octylphenol (OP) and technical grade 4-nonylphenol (NP), were obtained from Aldrich (Milwaukee, USA).

Alkylphenols (nonylphenol and octylphenol), alkylphenol ethoxylates (APnEO, nEO=1-15), bisphenol A (BPA) and 17 $\beta$ -estradiol were analysed using the LC-MS-MS method (Petrovic, 2003). LC-MS/(MS) analyses were performed on a Waters 2690 series Alliance HPLC (Waters, Milford, MA, USA) with a quaternary pump equipped with a 120-vial capacity sample management system. The analytes were separated on a 5  $\mu$ m, 125 x 2 mm i.d. C18 reversed phase column Purospher® STAR RP-18 endcapped (Merck, Darmstadt, Germany). The sample injection volume was set at 10  $\mu$ l. A binary mobile phase gradient with methanol (A) and water (B) was used for analyte separation at a flow rate of 200  $\mu$ l/min. The elution gradient was linearly increased from 30% A to 85% A in 10 min, then increased to 95% A in 10 min and kept isocratic for 5 min.

A bench-top triple quadrupole mass spectrometer Quattro LC from Micromass (Manchester, UK) equipped with a pneumatically assisted electrospray probe and a Z-spray interface was used for this study. The capillary voltage was set at 2.8 kV, extractor lens 7V and RF lens 0.6V. The source and desolvation temperatures were 150°C and 350°C, respectively. The nitrogen (99.999% purity) flows were optimized at 50 l/h for the cone gas and 540 l/h for the desolvation gas. For MS-MS experiments the argon collision gas was maintained at a pressure of  $5.8 \times 10^{-3}$  mbar.

Quantitative LC-MS-MS analysis of compounds detected under negative ionization (NI) conditions (NP, OP, BPA and 17b-estradiol) was carried out in multiple reactions monitoring (MRM) mode using oxybenzoic acid as the internal standard. Compounds detected under positive ionization (PI) conditions (NPEOs and OPEOs) gave only  $[M^+Na]^+$  adduct ions and produced no fragmentation. As a result these compounds were analyzed using a single stage MS in selected ion monitoring (SIM) mode using 4-nonylphenol mono ethoxylate-d2 as the internal standard. Table 3 shows the MRM and SIM ions, respectively, and the limits of detection (LODs) obtained.

Table III. LC-MS/(MS) conditions and limits of detection

A) Negative ionisation mode

Compound	MRM 1	Cone (V)	Collision (eV)	MRM 2	Cone (V)	Collision (eV)	LOD (ng/l)
NP	219 → 133	30	30	219 → 147	30	30	2
OP	205 → 133	30	30	205 → 147	30	30	2
BPA	227 → 133	30	30	227 → 211	30	30	2
E2	271 → 183	30	30	271 → 145	30	30	1

B) Positive ionisation mode

Compound	m/z	LOD (ng/l)
NPEO ( $n_{EO}=1-15$ )	287 + 44n	50 (NPEO <sub>1</sub> ) 20 (NPEO <sub>2</sub> ) 10 (NPEO, $n_{EO}=3-15$ )
OPEO ( $n_{EO}=1-15$ )	273 + 44n	50 (OPEO <sub>1</sub> ) 20 (OPEO <sub>2</sub> ) 10 (OPEO, $n_{EO}=3-15$ )



### 3. RESULTS AND DISCUSSION

The results for three selected estrogenic compounds are shown in Table 4, reporting the concentrations after the operations listed, as well as for the sludge lines. The results are presented in relation to the total sample volume.

Table IV – EDC concentrations measured by ELISA and LC-MS-MS.

Sample points	APEs ( $\mu\text{g/l}$ )		BPA ( $\mu\text{g/l}$ )		17 $\beta$ -estradiol (ng/l)	
	ELISA	LC-MS-MS	ELISA	LC-MS-MS	ELISA	LC-MS-MS
1	>ld	78.15	1.02	1.55	1.12	<ld
2	Int.	55.02	0.21	0.15	1.12	<ld
3	5.77		1.32		1.73	
4	0.724		>ld		1.38	
6	>ld	4.6	1.32	0.25	0.57	
5	9.73		>ld		1.38	
7	5.77	15.53	0.55	0.31	0.91	<ld
8	5.32	5.20	0.08	<ld	0.91	<ld

Int. – interference; ld – detection limit; N= 3 (mean values; sd < 7%)

The usual methods used in EDC determination are GC-MS and, more recently, LC-MS/MS (Petrovic *et al.*, 2004). However, the analytical instruments used are very expensive and complex, involving the need for qualified personnel to operate them. Sample treatment is also complex and time-consuming and large sample volumes are needed. Nevertheless, these traditional methods are accurate and give better results.

An inter-laboratory comparison exercise conducted by Castillo *et al.* (2000) to determine surfactants in wastewater used different analytical strategies based on liquid chromatography (LC) coupled with mass spectrometric (MS) or fluorescent (FL) detection and a test-tube enzyme-linked immunosorbent assay kit. The study reported that LC-MS techniques are reliable for surfactant determination and that ELISA (only used for nonylphenolpolyglycol ether determination) also gave acceptable results.

However, ELISA values were higher, which was attributed to the interference of cross-reacting substances.

Fránek *et al.* (2001) also developed an immunoassay for NP, and nonylphenol decaethoxylate (NPEO10), for sensitive analysis of water samples. However, assay sensitivity for technical NP standard ranged within the order of  $\text{mgL}^{-1}$ . The same authors concluded that this sensitivity can be used for screening of industrial wastewater effluents rather than for ground or river water analysis where the concentrations of NP are lower, usually not exceeding  $\text{mgL}^{-1}$  concentrations.

Hence, in this study LC-MS-MS results (Table 4) were used in addition to ELISA methods. As it was not necessary to measure all treatment steps, two incoming and two outgoing points were chosen to carry out the LC-MS-MS analytical procedure.

Although different analytical techniques were used in order to evaluate the presence of selected endocrine compounds, results both from ELISA and LC-MS-MS showed their presence throughout the WWTP. Even if LC-MS-MS did not detect E2, this does not mean that it is not present in the wastewater since the detection limits for LC-MS-MS are lower than ELISA. Furthermore, the sample volume needed for an LC-MS-MS analysis for steroids was much higher than that the amount that was used, which was suitable for ELISA testing.

The treated effluent is discharged into the River Tagus estuary and it can be suggested that the effluent is sufficiently diluted within the estuarine waters and no effects are expected to occur in wildlife. However, it should be considered that from its source the River Tagus receives many treated and non-treated effluents. Nevertheless, further research should be carried out with estuarine organisms in order to assess possible harmful effects at the ecosystem level.

The highest APE levels were found in incoming effluent (78 µg/l by LC-MS-MS and above detection limits with ELISA) and the lowest were recorded in outgoing effluent (5.20 µg/l by LC-MS-MS). With respect to the final effluent, the APE ELISA kit results showed that data were overestimated in comparison with LC-MS-MS. However LC-MS-MS results after filtration were higher than those with ELISA, a fact that cannot be easily explained. Analytical interference due to the limited selectivity of antibodies is referred to as cross-reactivity and is a common phenomenon to all immunoassays (Oubina *et al.*, 1997). Therefore, the CR of a particular compound becomes a problem when that compound is present in the samples being analysed at a concentration that is sufficiently high to increase the apparent concentration of the analyte of interest (Oubina *et al.*, 1997). The experiments developed by Goda *et al.* (2000) also suggest that ELISA may be subject to interference that gives an overestimated value because of the broader cross-reactivity. Thus, different APEO concentrations recorded by the analytical techniques used to screen the WWTP effluent can be explained to some extent by the cross-reactivity phenomenon.

However, recently, a new monoclonal antibody-based competitive immunoassays for quantitative and semi quantitative detection of 4-*n*-nonylphenol in water was developed by Samsonova *et al.* (2003). This monoclonal antibody was very sensitive to 4-*n*-nonylphenol and cross-reactivity was negligible to technical 4-nonylphenol (a mixture of branch isomers).

The highest E2 level was detected after the first sedimentation (1.73 ng/l) and slight variations in E2 values were detected along the WWTP stages. They are not significantly different and could be related in part to the wastewater microbiological activity and also the cross-reactivity with other steroids, as shown in Table 6. Although, LC-MS-MS did not detect E2 (above the detection limit) that does not mean that the compound is not present.

The highest BPA levels were found in the primary sludge (above detection limits) and concentrations underwent a significant reduction in the course of the treatment stages, indicating that BPA is efficiently removed from wastewater. Although the methods are not comparable, ELISA and LC-MS-MS results show similar levels of the compound, suggesting that the BPA kit is reliable and can be used safely.

Table V – EDC's removal (%) in each step of WWTP

		Removal (%)					
	Sampling points	APEs (µg/l)		BPA (µg/l)		17β-estradiol (E2) (ng/l)	
		ELISA	LC-MS-MS	ELISA	LC-MS-MS	ELISA	LC-MS-MS
<b>Preliminary treatment (Screening and grit removal)</b>	<b>1-2</b>	-	29,60	79,41	90,32	0,00	-
<b>1<sup>st</sup> sedimentation</b>	<b>2-3</b>	-	-	-528,57	-	-54,46	-
<b>Biological Treatment (aeration tank and 2<sup>nd</sup> sedimentation)</b>	<b>3-5</b>	-68,63	-	-	-	20,23	-
<b>Filtration</b>	<b>5-7</b>	40,70	-	-	-	34,06	-
<b>Desinfection (U.V.)</b>	<b>7-8</b>	7,80	66,52	85,455	>99.35	0,00	-
<b>Influent /Effluent</b>	<b>1-8</b>	>99.47	93,35	92,16	>99.87	18,75	-

Table 5 shows that it is unequivocal that this treatment process is efficient for the removal of most target compounds (removal between point 1 and 8). However, there are some steps of the treatment process where the removal is negative, nominated between point 2 and 3 and point 3 and 5. A possible explanation can be related to biological treatment processes and cross-reactivity phenomenon.

This study also allowed us to test recently developed ELISA kits from the point of view of their potential use in routine monitoring programs covering the presence and quantification of EDCs in WWTP effluents. The results showed that the ELISA Kits tested can be used to monitor the presence of EDCs in WWTP effluent, though precautions should be taken when interpreting results due to several sources of interference that can alter the identification of chemicals.

Even though the kits tested are suitable for detecting the presence of the selected EDCs, the compound concentrations achieved by ELISA should be treated carefully as they may not reflect real values, due to the interference mentioned above.

Table VI. Cross-reactions of ELISA with APE, Bisphenol A, and 17 $\beta$ -Estradiol (E2).

Compounds	% CR	Compounds	%CR	Compounds	%CR
<b>Nonionic surfactants</b>		<b>Bisphenol A</b>	100	<b>Estrogens</b>	
<b>NPE(Nonylphenol ethoxylate)</b>		<b>Alkylphenol</b>	<0.1	Estrone (E1)	1.3
NP10EO, NP7.5EO	100	t-Octylphenol	0.12	2-methoxy E1	<0.4
NP5EO	80	t-Nonylphenol	<0.1	E1-3-sulfate	1.0
NP2EO	40	Phthalate Ester	<0.1	17 $\beta$ -Estradiol (E2)	100.0
NP1EO	20	Diethylhexylphthalate(DEH P)	<0.1	16-keto E2	16.0
OPE(Octylphenol ethoxylate)	230	Butylbenzylphthalate(BBP)		2-methoxy E2	2.0
OP10EO	<0.2	Dibutylphthalate(DBP)		E2-17-glucronide	<0.4
AE (Alkyl ethoxylate)				E2-3-glucronide	16.0
				E2-3-sulfate-17	<0.4
				Estriol (E3)	0.6
				16-epi-E3	0.5
				E3-16-glucronide	<0.4
<b>Anionic surfactants</b>				<b>Other Hormones</b>	<0.03–
<b>LAS, SOAP, SDS,</b>	<0.2				0.46
<b>AES, Phenol, PEG</b>					

Adopted from Takeda Chemical Industries (Japan).

#### **4. CONCLUSIONS**

The compounds screened are present in the effluent in varying concentrations throughout the treatment process and are discharged into estuarine waters at levels that may cause physiological effects in wildlife, as shown by both the ELISA and LC-MS-MS data. However, the estuarine waters may also have a diluting effect, reducing EDC concentrations and consequently the availability to their absorption by aquatic organisms.

The ELISA assays used in this study are suitable for routine screening of the selected chemicals. However, care should be taken if the results are intended to provide absolute values or are to be used to assess the kinetics of EDC bioremoval.

Considering that there are various river and estuarine organisms of commercial value that may bio-accumulate EDCs and be consumed by humans, and that river water is also used in the production of drinking water, public health problems may arise from the exposure to estrogenic chemicals. Accordingly, further research should be focused on the detection and identification of EDCs in the estuarine environment.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

To the Portuguese Foundation for Science and Technology (FCT/MC) to its financial support to the project “Comprehensive Assessment of Impacts of Endocrine Disruptors Compounds from Urban Wastewater”, (POCTI/36303/MGS/2000) and also the authors PhD grant (SFRH/BD/3098/2000 and SFRH/BD/3093/2000). We also thank to Eng. J. Martins from SIMTEJO (Chelas- Waste Water Treatment Plant) for WWTP facilities in the sampling procedure. The Takeda Chemical Industries (Japan) for giving us the opportunity to test the ELISA Kits.

## REFERENCES

Arukwe, A.: 2001, 'Cellular and Molecular Responses to Endocrine-Modulators and the Impact on Fish Reproduction', *Mar. Poll. Bull.*, vol. 42, nº8, 643-655.

Castillo, M., Riu J., Ventura, F., Boleda, R., Scheduling, R., Schroder, H.Fr., Nistor, C., Emneus, J., Eichhorn, P., Knepper, Th.P., Jonkers, C.C.A., de Voogt, P., Gonzalez-Mazo, E., Leon, V.M., Barceló, D.: 2000, 'Inter-laboratory comparison of liquid chromatographic techniques and enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of surfactants in wastewaters', *J. Chromat. A*, 889, 195–209.

Fránek, M., Zeravík, J., Eremin, S.A., Yakovleva, J., Badea, M., Danet, A., Nistor, C., Ocio, N., Emnéus, J.: 2001, 'Antibody-based methods for surfactant screening', *Fresenius J Anal Chem.* 371, 456–466.

Furhacker, M., Scharf, S. Weber, H.: 2000, 'Bisphenol A: emissions from point sources', *Chemosphere* 41, 751-756.

Goda, Y., Kobayashi, K., Fukuda, S., Fujimoto, M., Ike, M. And Fujita, M.: 2000, 'Development of the ELISAs for detection of hormone-disrupting chemicals' *Water Sci. Technol.* 42 (7-8), 81-88.

Jobling, S., Casey, D., Rodgers-Gray, T., Oehlmann, J., Schulte- Oehlmann, U., Pawlowski, S., Baunbeck, T., Turner, A.P., Tyler, C.R.: 2003, 'Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent', *Aquat. Toxicol.* 65, 205 - 220.

Korner, W., Hanf, V., Schuller, W., Bartsch, H., Zwirner, M., and Hanspaul, H.: 1998, 'Validation and application of a rapid *in vitro* assay for assessing the estrogenic potency of halogenated phenolic chemicals' *Chemosphere*, vol.37, n°9-12, 2395-2407.

López de Alda, M.J.L., and Barceló, D.: 2001, 'Review of analytical methods for the determination of estrogens and progestogens in waste waters', *Fresenius J. Anal. Chem.*, 371 (4): 437-447.

Matsui, S. Takigami, H., Matsuda, T., Taniguchi, N., Adachi, J., Kawami, H. and Shimizu, Y.: 2000, 'Estrogen and estrogen mimics contamination in water and the role of sewage treatment', *Water Sci. Technol.* 42:12, 173-179.

Nichols, K.M., Snyder, E.M., Snyder, A., Pierens, S.L., Miles-Richardson, S.R. And Giesy, J.P.: 2001, 'Effects of nonylphenol ethoxylate on reproductive output and bioindicators of environmental estrogen exposure in fathead minnows, *Pimephales promelas*' *Environ. Toxicol. Chem.* vol.20, N°3, 510-522.

Oubina, A., Gascón, J., Barceló, D.: 1997, Multianalyte effect in the determination of cross-reactivities of pesticide immunoassays in water matrices' *Anal. Chimica Acta*, 347, 121-130.

Petrovic, M., Diaz, A., Ventura, F., and Barceló, D.: 2001, 'Simultaneous Determination of Halogenated Derivatives of Alkylphenol Ethoxylates and their Matabolites in Sludges, Rives Sediments, and Surface, Drinking, and Wastewaters by Liquid Chromatography – Mass Spectrometry' *Anal. Chem.* 73, 5886-5895.



Petrovic, M., Eljarrat, E., Alda, M.J.L., Barceló, D.: 2002, 'Recent advances in the mass spectrometric analysis related to endocrine disrupting compounds in aquatic environmental samples' *J. Chromat. A*, Volume 974, Issues 1-2, 23 - 51.

Petrovic, M., Barceló, D.: 2002, 'Review of Advanced Sample Preparation Methods for the Determination of Alkylphenol Ethoxylates and Their Degradation Products in Solid Environmental Matrices', *Chromatographia* 56, 535-544.

Petrovic, M., Eljarrat, E., Lopez de Alda, M. J., Barceló, D.: 2004, 'Endocrine disrupting compounds and other emerging contaminants in the environment: A survey on new monitoring strategies and occurrence data', *Anal Bioanal Chem*, 378, 549-562.

Petrovic, M., Diaz, A., Ventura, F. and Barceló, D.: 2003, 'Low Nanogram Per Liter Determination of Halogenated Nonylphenols, Nonylphenol Carboxylates and Their Non-Halogenated Precursors in Water and Sludge by Liquid Chromatography-Electrospray-Tandem Mass Spectrometry', *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 14, 516-527.

Routledge, E.J., Sheahan, D., Desbrow, C., Brighty, G.C., Waldock, M., Sumpter, J.P.: 1998, 'Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach', *Environ. Sci Tech.*, vol. 32, no. 11, pp. 1559-1565.

Samsonova, J.V., Rubtsova, M.Y., Fránek, M.: 2003, 'Determination of 4-n-nonylphenol in water by enzyme immunoassay', *Anal Bioanal Chem.* 375 : 1017–1019.

Sumpter, J.P.: 1995, 'Feminized responses in fish to environmental estrogens', *Toxicol. Lett.* 82/83, 737-742.

Takeda Chemical: 2002, 'Takeda test Kit – APE ELISA Kit User's Guide. Version 02.01', *Takeda Chemical Industries Ltd., Japan*. P.9.

Takeda Chemical: 2002, 'Takeda test Kit – BPA ELISA Kit User's Guide. Version 01.03', *Takeda Chemical Industries Ltd., Japan*. P.9.

Takeda Chemical: 2002, 'Takeda test Kit – E2 ELISA Kit User's Guide. Version 01.02', *Takeda Chemical Industries Ltd., Japan*. P.9.

Tsuda, T., Suga, K., Kaneda, E., Ohsuga, M.: 2000, 'Determination of 4-nonylphenol monoethoxylate, Nonylphenol diethoxylate and other alkylphenols in fish and shellfish by high-performance liquid Chromatography with fluorescence detection', *J. Chromat. B*, 746, 305-309.

**4.2. AVALIAÇÃO DA REMOÇÃO DO NONILFENOL NUMA ESTAÇÃO DE  
TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUAIS URBANAS. EFEITOS DA EXPOSIÇÃO EM  
CARPAS (*CYPRINUS CARPIO*)**

## **Avaliação da remoção do nonilfenol numa estação de tratamento de Águas residuais urbanas. Efeitos da Exposição em carpas (*CYPRINUS CARPIO*)**

Mário Diniz; **Rita Maurício**; Eduardo Mateus; Leonor Amaral; Isabel Peres; Luísa Castro; Fernando Santana

### **RESUMO**

O impacte de compostos xenobióticos no meio aquático tem gerado graves modificações nos ecossistemas, nomeadamente o desequilíbrio das populações relativamente à sua composição (machos/fêmeas) associado ao efeito de compostos disruptores endócrinos, cujas consequências não são ainda previsíveis.

O presente estudo pretendeu avaliar a remoção de nonilfenol numa Estação de Tratamento de Águas Residuais (ETAR) e inferir sobre os efeitos da desregulação endócrina em carpas. Verificou-se uma diminuição significativa (> 95%) da concentração de nonilfenol ao longo da linha de tratamento da ETAR, reduzindo os potenciais efeitos que, de outra forma, poderia causar sobre o ambiente.

Os testes experimentais realizados com carpas expostas a diferentes concentrações de nonilfenol, mostram que estes organismos bioacumularam este composto em maior quantidade no fígado. Os resultados da análise histológica indicam que o nonilfenol causou efeitos histopatológicos em *C. Carpio*.

**PALAVRAS CHAVE:** Disruptores Endócrinos, nonilfenol, Tratamento de Águas Residuais, Bioacumulação, Carpas

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos 50 anos, alguns compostos sintéticos como os alquilfenóis polietoxilatos (APEOs), foram amplamente utilizados em variadas aplicações industriais, comerciais e domésticas (Tsuda, *et al.*, 2000), com uma produção anual da ordem de 350 000 tons., nos EUA, Europa e Japão, o que certamente justifica a sua presença nas águas residuais e, ou no meio aquático (Nichols, *et al.*, 2001).

Alguns destes compostos xenobióticos, presentes em efluentes e lamas industriais, são estrogénicos (tais como o nonilfenol (NP)), outros derivados de alquilfenóis, PCB's, dietil-etoxilatos, etc.) e podem induzir alterações nas funções endócrinas de peixes e outros organismos, nomeadamente o desequilíbrio das populações relativamente à composição (macho / fêmea). Estudos realizados em diferentes espécies de peixes expostos a NP mostraram diversas anomalias, nomeadamente ao nível da morfologia e histologia das gónadas, estimulando a produção de vitelogenina nos machos de algumas espécies (Arukwe, *et al.*, 2000; Schwaiger, *et al.*, 2000).

Por este motivo, existe actualmente uma preocupação crescente com o uso indiscriminado destes compostos, principalmente devido à relativa estabilidade de alguns metabolitos de degradação de produtos contendo APEOs, gerados durante os processos de tratamento de águas residuais (Blackburn e Waldock, 1995).

Relativamente ao nonilfenol está demonstrado que é tóxico, tanto para espécies de água doce, como para espécies marinhas, induzindo respostas estrogénicas na truta macho e revelando efeitos de bioacumulação em organismos de água doce (Jobling e Sumpter, 1993; Purdom *et al.*, 1994). Assim, é cada vez maior a convicção de que estes compostos sintéticos podem constituir potenciais disruptores endócrinos (ED's).

A informação disponível, relativamente ao efeito das elevadas descargas nos meios receptores e da sua potencial toxicidade é ainda muito limitada, nomeadamente em sistemas aquáticos.

Por outro lado, a informação sobre remoção de ED's em estações de tratamento de águas residuais (ETARs) é igualmente muito escassa, circunstância que impede a realização de estimativas de balanços materiais, indispensáveis à previsão dos correspondentes impactes nos meios hídricos.

Para uma correcta interpretação dos riscos ambientais associados a estes compostos, há que adoptar uma abordagem integrada, envolvendo os respectivos fluxos materiais, desde a sua origem às ETARs, aos solos, às reservas de águas e à sua relação com os indivíduos expostos.

Qualquer tipo de análise da poluição da água provocada por compostos orgânicos deve incluir uma avaliação da sua biodegradação nos meios receptores ou nas ETARs. Para analisar a biodegradação destes compostos, tendo em conta as quantidades presentes nas águas residuais (significativas ou negligenciáveis) é necessário avaliar de uma forma global o seu comportamento, associando-o às suas utilizações, para que desta forma seja mais fácil estimar o seu efeito nos sistemas aquáticos.

Com efeito, a biodegradação é um processo relevante para a remoção de poluentes orgânicos e, conseqüentemente, poderá contribuir para minimizar os efeitos negativos dos ED's no ambiente. Os mecanismos de remoção do NP são ainda pouco conhecidos, envolvendo fenómenos de volatilização, de adsorção e de natureza bioquímica. Assim, e no que respeita à remoção de ED's em ETARs, é evidente a

necessidade de aprofundar o conhecimento sobre processos de remoção em bio-reactores, designadamente os mecanismos e cinéticas de reacção envolvidas.

O presente trabalho inserido num projecto mais amplo, envolvendo diversos compostos ED's, centra-se no o estudo da remoção do NP na fase solúvel, ao longo de uma linha de tratamento, designadamente a ETAR de Chelas/Lisboa, por forma a avaliar condições e mecanismos determinantes para aquele processo, bem como os aspectos relacionados com a sua remoção por separação sólido/líquido (Figura 1).

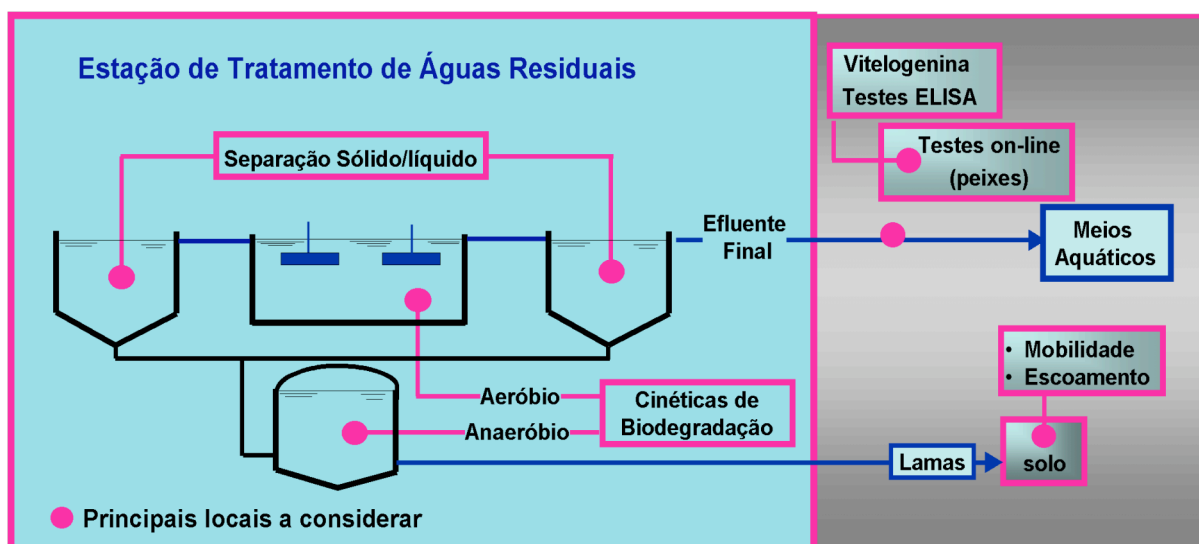


Figura 1 – Avaliação do balanço de massa do nonilfenol numa ETAR, e análise da exposição em peixes

De igual modo foram realizados testes laboratoriais, utilizando carpas como material biológico, para averiguar possíveis efeitos do NP sobre o biota.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Análise de NP em Águas Residuais

O presente estudo foi desenvolvido na ETAR de Chelas / Lisboa, que apresenta um caudal médio diário anual de aproximadamente 49 000 (m<sup>3</sup>/dia), processando, principalmente águas residuais urbanas, atendendo uma população de cerca de 211 000 habitantes (EMARLIS). Os pontos de amostragem encontram-se identificados na Figura 2.

### 2.2 Recolha das Amostras de Águas Residuais

As amostras de águas residuais foram recolhidas na ETAR em Junho de 2001, abrangendo períodos diários de 16 horas (das 8 às 24 horas) durante uma semana. As amostras foram transportadas para o laboratório em malas térmicas refrigeradas, sendo em seguida filtradas (Macherey-Nagel, MN GF –3, porosidade de 0,60 µm).

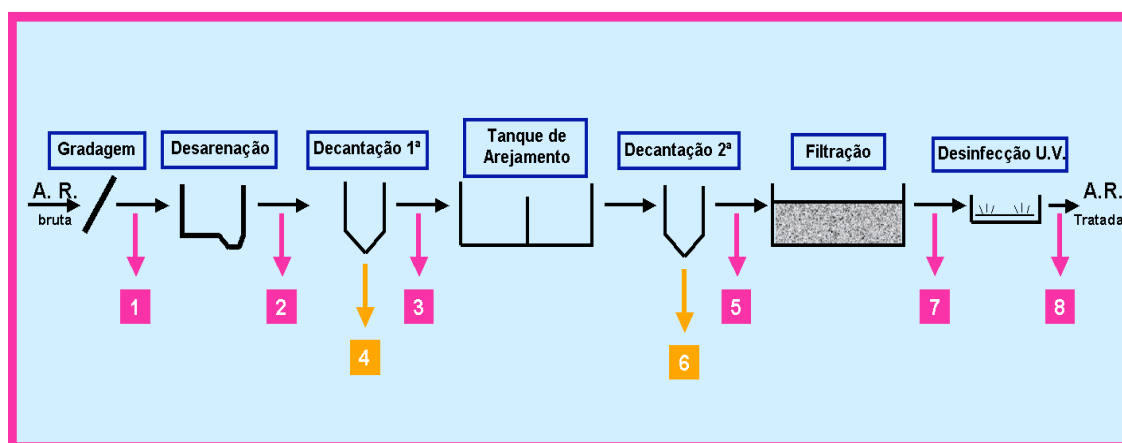


Figura 2 – Identificação dos pontos de amostragem na linha de tratamento da ETAR de Chelas



## **2.3. Processamento das Amostras**

### **2.3.1. Extração dos compostos**

A extração dos compostos presentes nas amostras, foi efectuada utilizando colunas com duas fases (liChrolut RP – 18 (40-63 $\mu$ m ) e liChrolut EN (40-120 $\mu$ m), e eluídas com 2 x 5.0 ml de acetona (a 100%), segundo um método baseado em Stumpf *et al.* (1996) e descrito por Weltin *et al.* (1998).

Posteriormente, as amostras foram concentradas até 1 ml, com azoto líquido à temperatura ambiente.

### **2.3.2. Determinação do NP**

Foi utilizado um sistema de HPLC (Merck-Hitachi, L-6200A), utilizando uma coluna (Merck) de 4.0 x 125mm, Licosphere RP18 (5 $\mu$ m) equipado com detector de fluorescência (Merck-Hitachi, F-1050). As condições de operação do detector de fluorescência foram as seguintes: Ex 275 nm, Em 300 nm; temperatura da coluna, 40°C; flow-rate 1,0 ml/min.; fase móvel, A= água (ultrapura), B= acetonitrilo: gradiente linear.

## **2.4. Testes de Exposição em Carpas**

### **2.4.1. Condições experimentais**

Doze carpas (*Cyprinus carpio*), provenientes do Aquário Vasco da Gama (Lisboa), sexualmente maduras (peso médio: 14,59  $\pm$  2,36g), foram distribuídas em três grupos e mantidas em aquários de 50 litros, contendo água da rede de abastecimento, com remoção prévia de cloro, a uma temperatura constante de 15 $\pm$ 1°C e sujeitas a um

regime de fotoperíodo de 16H Luz : 8H Escuro. Os animais foram alimentados diariamente com ração peletizada (Alpis).

A água dos aquários foi contaminada com concentrações nominais de 0, 25 e 100 mg/l de 4-n-Nonilfenol (Fluka, Chemika 74430). Durante o período de duração do teste (28 dias) procedeu-se à renovação da água do meio de dois em dois dias.

No final do teste os peixes foram pesados, medidos e extraídos os órgãos (fígado, gónadas, rim e músculo). O tamanho das gónadas foi expresso em percentagem da massa corporal total (Índice Gonadossomático, GSI). Uma fracção dos órgãos foi removida e fixada numa solução aquosa de fixador Bouin-Hollande. Os órgãos fixados foram preparados para exame histológico através dos procedimentos usuais em histologia. Outra fracção foi armazenada a menos 80°C para análise posterior da concentração de NP nos órgãos.

#### **2.4.2. Determinação do NP nos órgãos.**

Amostras dos órgãos (300 mg) foram homogeneizadas em 3ml de acetonitrilo. O homogeneizado foi centrifugado a 2000 g e o sobrenadante retirado e filtrado (Macherey Nagel com uma porosidade de 0,45µm) para análise por HPLC . A recuperação neste procedimento foi superior a 80%. A determinação de NP por HPLC seguiu o procedimento anteriormente descrito.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 3, apresentam-se as concentrações de NP nos diversos pontos de amostragem ao longo da linha de tratamento. As análises revelaram níveis apreciáveis de NP à entrada da linha de tratamento. No entanto, verifica-se uma redução da concentração de nonilfenol ao longo da ETAR, o que pressupõe alguma eficiência de remoção por parte dos órgãos que constituem a referida estação.

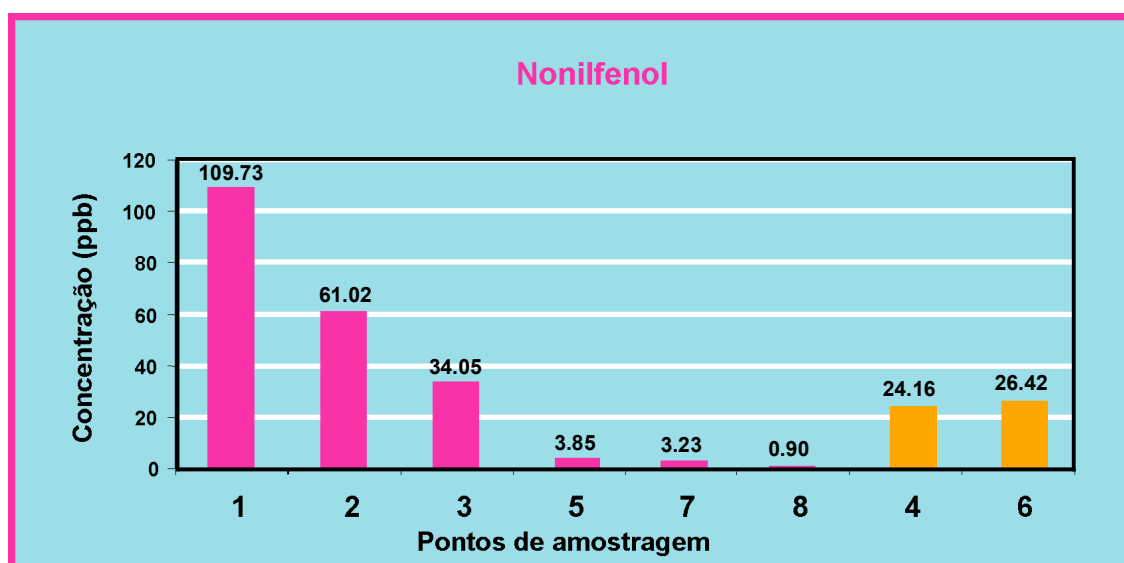


Figura 3 – Evolução da concentração de nonilfenol ao longa da ETAR

Na figura 4. mostra-se a variação da remoção nos diversos tipos de tratamento da ETAR

Tipo de Tratamento	Percentagem de Remoção (%)				
	20	40	60	80	100
Tratamento Preliminar		◆			
Tratamento Primário		◆			
Tratamento Secundário				◆	
Tratamento de Afinação	◆				

Figura 4. – Percentagens de Remoção

Constata-se que embora a remoção relativa mais elevada ocorra no tratamento secundário, em termos quantitativos a maior fracção é removida no tratamento preliminar, como decorre da figura 3. Admite-se que este comportamento seja consequência das características do NP, pouco solúvel em água, podendo portanto ser removido conjuntamente com as gorduras.

Na figura 5, encontram-se expressos os níveis de NP nos órgãos dos peixes sujeitos às condições experimentais de laboratório, evidenciando-se a maior concentração no fígado, o que sugere que este órgão desempenha um papel importante na bioacumulação de NP em *Cyprinus carpio*.

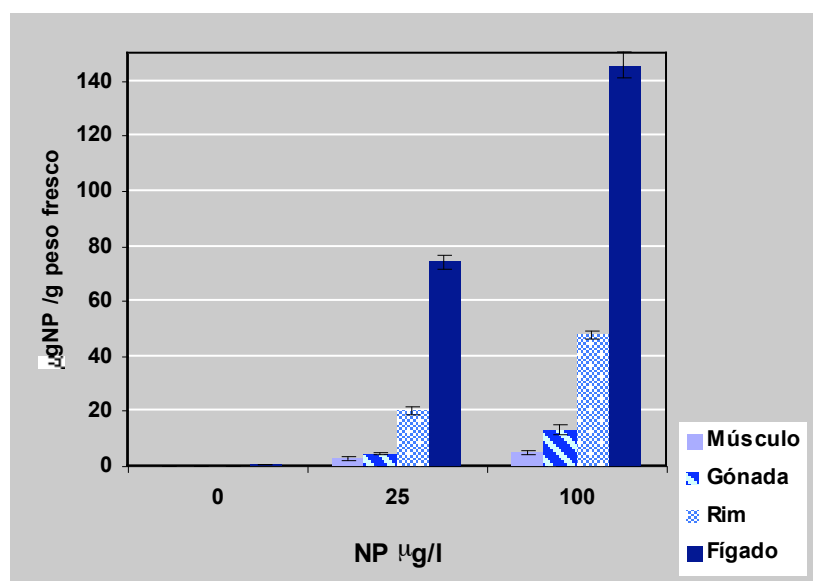


Figura 5 - Teores de NP ( $\mu\text{g/g}$  peso fresco) em músculo, rim, gónada e fígado de carpa, expostos a diferentes concentrações de NP na água (0,25 e 100  $\mu\text{g/l}$ ).

Na Figura 6, mostra-se o índice gonadosomático (GSI) salientando-se o decréscimo verificado nos animais expostos.

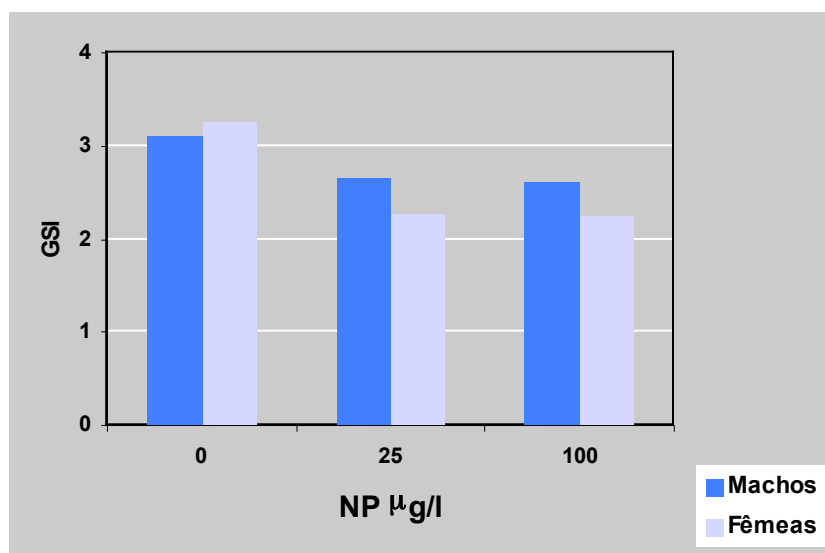


Figura 6 - Índice Gonadosomático em carpas expostas a 0, 25 e 100  $\mu\text{g/l}$  de NP.

As análises histológicas dos testículos dos organismos expostos revelaram efeitos do NP sobre a estrutura testicular, observando-se as alterações histopatológicas mais pronunciadas nos organismos expostos a 100  $\mu\text{g/l}$  de NP, verificando-se

nomeadamente a redução do diâmetro dos lóbulos seminíferos (Figura 7). A diminuição do GSI nos organismos expostos parece indicar um efeito da exposição ao NP sobre a massa das gónadas, apoiando os dados que indicam a existência das respectivas alterações histopatológicas, com possíveis consequências ao nível da capacidade reprodutiva dos organismos.

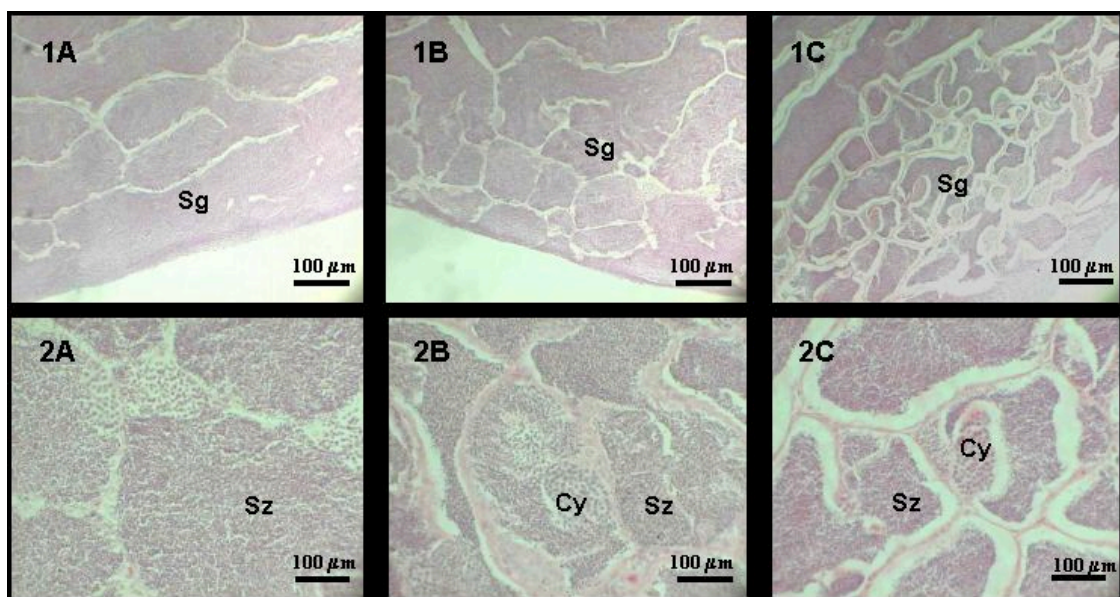


Figura 7 - Gónada de *Cyprinus carpio* (macho), mostrando-se os lóbulos seminíferos no controlo (1A-2B) e nos animais expostos a 25 e 100 µg/l /l (1B-2B e 1C-2C, respectivamente). Note-se a redução do diâmetro dos lóbulos nos animais expostos. Legenda: Sg (lóbulos seminíferos); cy (cistos espermatogénicos) Sz (espermatozoa). Ampliação 100x (1A, 1B, 1C); Ampliação 400x (2A, 2B, 2C). Coloração HE. (cortes 5 µm)

Assim, os resultados obtidos com o teste de exposição dos organismos ao NP mostram que, para concentrações da ordem das que foram obtidas na afluência à ETAR, os efeitos sobre os peixes são significativos, relevando portanto a importância dos sistemas de tratamento. Por outro lado, importa averiguar aqueles efeitos para concentrações substancialmente inferiores, ou seja, para simular condições do meio

receptor da descarga do efluente tratado, aspecto contemplado no projecto de I&D em curso, o qual incluirá o estudo do material biológico em ensaios contínuos com diferentes diluições do efluente final.

#### **4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Arukwe, A., Thibaut, R., Ingebrigsten, K., Celius, T., Goksoyr, A., Cravedi, J-P. (2000). In vivo an in vitro metabolism and organ distribution of nonylphenol in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquatic Toxicology*, 49 (249), 289-304.

Blackburn, M.A., Waldock, M.J., 1995. Concentrations of alkylphenols in rivers and estuaries in England and Wales. *Wat. Res.* 29 (7), 1623 – 1629.

Jobling, S., Stumpter, J.P., Detergent components in sewage effluent are weakly estrogenic to fish: An in vitro study using rainbow trout (*Aquat. Toxicol.* 27 (1993) 361.

Nichols, K.M., Snyder, E.M., Snyder, A., Pierens, S.L., Miles-Richardson, S.R. And Giesy, J.P. (2001). Effects of nonylphenol ethoxylate on reproductive output and bioindicators of environmental estrogen exposure in fathead minnows, *Pimephales promelas*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol.20,Nº3, 510-522.

Schwaiger, J., Spieser, O.H., Bauer, C., Ferling, H., Mallow, U., Kalbfus, W., Negele, R.D. (2000). Chronic toxicity of nonylphenol and ethinylestradiol: haematological and histopathological effects in juvenile Common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquatic Toxicology*, 51, 69-78.

Tsuda, T., Suga, K., Kaneda, E., Ohsuga, M. (2000). Determination of 4-nonylphenol monoethoxylate, Nonylphenol diethoxylate and other alkylphenols in fish and shellfish by high-performance liquid Chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 746, 305-309.

Weltin, D., Mateus, E., Bilitewski, B., and Santana, F. (1998). Measurement of Endocrine Disrupting compounds in sewage treatment plants and sewage sludges. In “European Conference on the Sustainable Development and Quality of Water & European Workshop on Environmental Technologies ‘98”. Nancy, France, 6-10 October.

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ESTROGÉNICO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-  
QUÍMICA DA ETAR DE CHELAS (LISBOA)**



## **Avaliação do Potencial Estrogénico e Caracterização Físico-Química da ETAR de Chelas (Lisboa)**

**Maurício, R.**, Diniz, M., Petrovic, M., Amaral, L. Peres, I.,  
Santana, F., Barceló, D.

### **RESUMO**

O presente estudo pretendeu avaliar o potencial estrogénico no efluente tratado de uma ETAR (Chelas-Lisboa) através da determinação de alguns compostos alvo, previamente seleccionados (alquilfenóis, 17 $\beta$ -estradiol, bisphenol A), conhecidos pela sua capacidade em desregular o sistema endócrino dos organismos. Recolheram-se amostras ao longo da linha de tratamento d uma ETAR que, após processamento foram analisadas por LC-MS/MS e ELISA. Os resultados mostraram a presença destes compostos ao longo da linha de tratamento da ETAR, em alguns casos com concentrações com potencial para desregular o sistema endócrino de organismos vivos. Para complementar a informação procedeu-se à determinação de alguns parâmetros físico-químicos (temperatura, pH, oxigénio dissolvido, Sólidos Suspensos Totais (SST), Sólidos Suspensos Voláteis (SSV), Carência Química de Oxigénio (CQO), uma vez que é sabido que estes influenciam a taxa de degradação e consequentemente a disponibilidade dos EDCs.

**PALAVRAS CHAVE:** desreguladores endócrinos, ETAR, ELISA, LC-MS/MS

## INTRODUÇÃO

Após 1990 intensificou-se a preocupação na comunidade científica e na opinião pública relativamente a um conjunto de compostos químicos presentes no ambiente com capacidade para interagir com o sistema endócrino e provocar efeitos adversos nos organismos. Deste modo, tem-se multiplicado programas de monitorização para identificar a presença destes compostos em estações de tratamento de águas residuais (ETAR), assim como no meio hídrico (Gutendorf and Westendorf, 2001; Hemming *et al.*, 2004). Para além disso, tem sido desenvolvidos ou propostos novos métodos de análise para identificação destes compostos.

Assim, é sabido existirem compostos químicos e respectivos produtos de degradação com actividade estrogénica que persistem nos efluentes de ETARs mesmo após tratamento, existindo uma crescente preocupação relativamente à influência destes no ambiente (Desbrow *et al.*, 1998). Estes compostos são geralmente designados por compostos desreguladores endócrinos (EDCs) em virtude de poderem afectar a saúde humana assim como a de outros organismos (Sumpter, 1998).

Assim, os compostos de origem antropogénica descritos como mimetizando os esteroídes endógenos incluem: - os surfactantes não-iónicos alquilfenóis polietoxilatos (APEs), que são amplamente utilizados numa vasta diversidade de aplicações domésticas e comerciais (Tsuda *et al.*, 2000), sendo utilizados como emulsionantes nos produtos de limpeza industriais e domésticos (Nichols *et al.*, 2001). Durante o tratamento de águas residuais urbanas e industriais, os APEs são degradados sucessivamente até formas menos biodegradáveis, como por exemplo o NP

(nonilfenol) e o OP (octilfenol), acabando por ser descarregados no ambiente aquático (Arukwe, 2000).

Existem ainda, compostos naturais, presentes no ambiente aquático, com actividade estrogénica como por exemplo os fitoestrogénios, estrogénios com origem nos produtos de excreção humana, como por exemplo o 17- $\beta$ -estradiol, a estrona e o estriol (Tyler *et al.*, 1998). Para além dos EDCs já conhecidos, muitos outros novos compostos são sintetizados anualmente e descarregados para o ambiente com consequências desconhecidas, e muitos potencialmente com actividade estrogénica (Petrovic, *et al.*, 2004). Com efeito, mais de 70 compostos químicos foram referidos como potenciais EDCs. No entanto, estima-se que mais de 80 000 compostos químicos produzidos pelo homem sejam de uso corrente e por isso se encontrem nos efluentes de ETARs, assim como os seus produtos de degradação (Sumpter, 1997).

A informação disponível, relativamente ao efeito das descargas elevadas nos meios receptores e da sua potencial toxicidade, nomeadamente em sistemas aquáticos é escassa. Além disso, existe pouca informação sobre remoção de EDCs em estações de tratamento de águas residuais (ETARs), circunstância que impede a realização de estimativas de balanços materiais. Deste modo, diversos bioensaio, assim como diversas técnicas analíticas têm sido empregues com o intuito de identificar e averiguar a actividade de compostos potencialmente estrogénicos (Céspedes *et al.* 2004)

O presente trabalho assenta fundamentalmente no estudo do efluente tratado da ETAR de Chelas (Lisboa), que trata diariamente grandes caudais de águas residuais

urbanas mas também caudais consideráveis, embora variáveis, de águas residuais industriais, servindo uma das zonas de maior densidade populacional do país.

Por forma a estudar e avaliar o potencial estrogénico no efluente tratado da ETAR procedeu-se à determinação de alguns compostos EDCs (alquilfenóis, 17 $\beta$ -estradiol, bisphenol A) previamente seleccionados, tendo em conta a sua capacidade para desregular o sistema endocrino dos organismos e metais pesados (Ni, Cr, Cu). Recolheram-se amostras ao longo da linha de tratamento da ETAR que, após processamento foram analisadas por LC-MS/MS e ELISA. Os resultados mostram a presença destes compostos ao longo da linha de tratamento da ETAR, em alguns casos com concentrações com potencial para desregular o sistema endócrino de organismos vivos.

Para complementar a informação procedeu-se à determinação de alguns parâmetros físico-químicos (temperatura, pH, oxigénio dissolvido, Sólidos Suspensos Totais (SST), Sólidos Suspensos Voláteis (SSV), Carência Química de Oxigénio (CQO), Azoto Total), uma vez que é sabido que estes influenciam a taxa degradação e consequentemente a disponibilidade dos EDCs. Os resultados são discutidos face aos conhecimentos actuais no que diz respeito aos níveis de EDCs e caracterização físico-química da ETAR em causa.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

As amostras de águas residuais foram recolhidas ao longo da linha de tratamento da ETAR de Chelas (Figura 1 e Figura 2) em Junho de 2003, abrangendo períodos diários de 16 horas (das 8 às 24 horas) durante uma semana. As amostras foram

transportadas para o laboratório em malas térmicas refrigeradas, sendo em seguida filtradas (Macherey-Nagel, MN GF –3, porosidade de 0,60  $\mu\text{m}$ ).

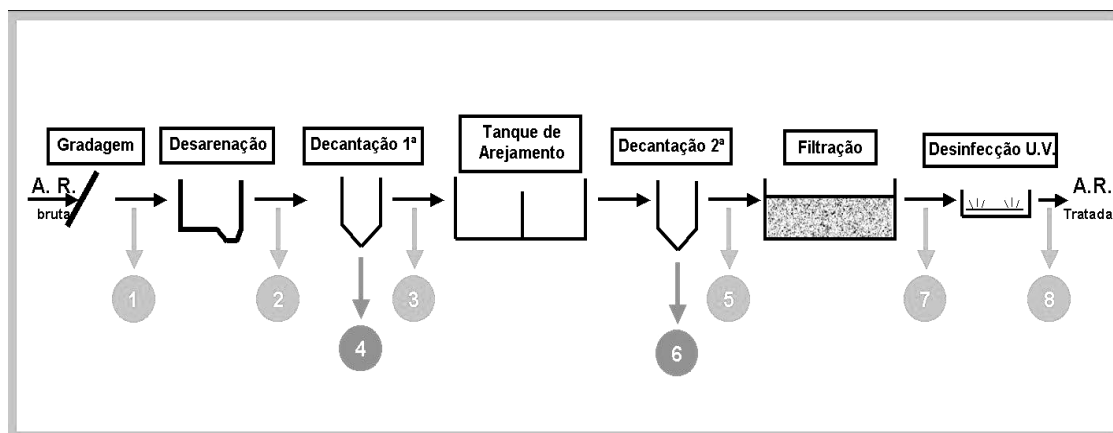


Figura 1 – Esquema da linha de tratamento da ETAR de Chelas

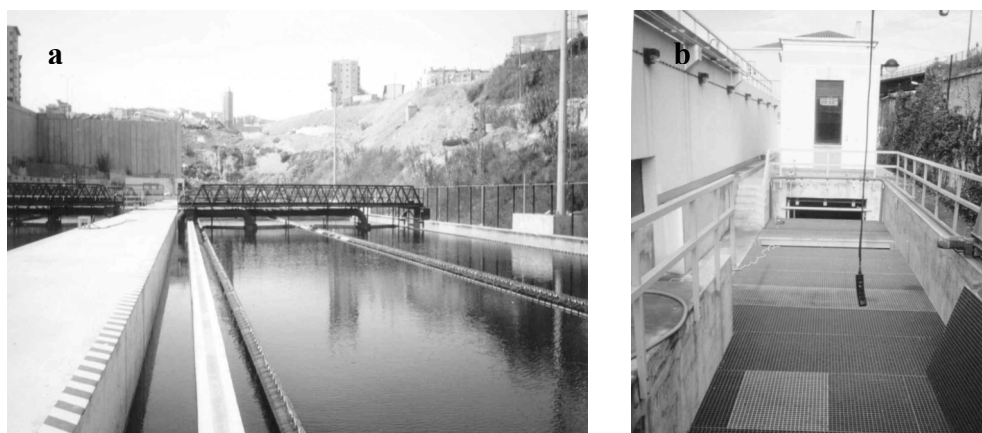


Figura 2 - a – ETAR de Chelas (Decantadores secundários) ; b – Tratamento por Ultra-Violetas

A metodologia para o pré-tratamento das amostras e para a extracção dos diferentes compostos foi desenvolvida, análise em ELISA (Enzyme linked immunoassay), pela Takeda Chemical Industries, Ltd e ,para análise em LC-MS-MS, por Petrovic *et al.* (2002).

Na análise através de ELISA, a extracção de BPA, 17 $\beta$  Estradiol e APE, foi efectuada utilizando colunas OASIS HLB 3cc da Waters, sendo eluídas com 2 x 5.0 ml de metanol a 10% para o BPA e APE, e com 2 x 5.0 ml de diclorometano (100%) para o 17 $\beta$  Estradiol. Posteriormente, as amostras foram concentradas até 2 ml, com azoto líquido à temperatura ambiente (Figura 3).

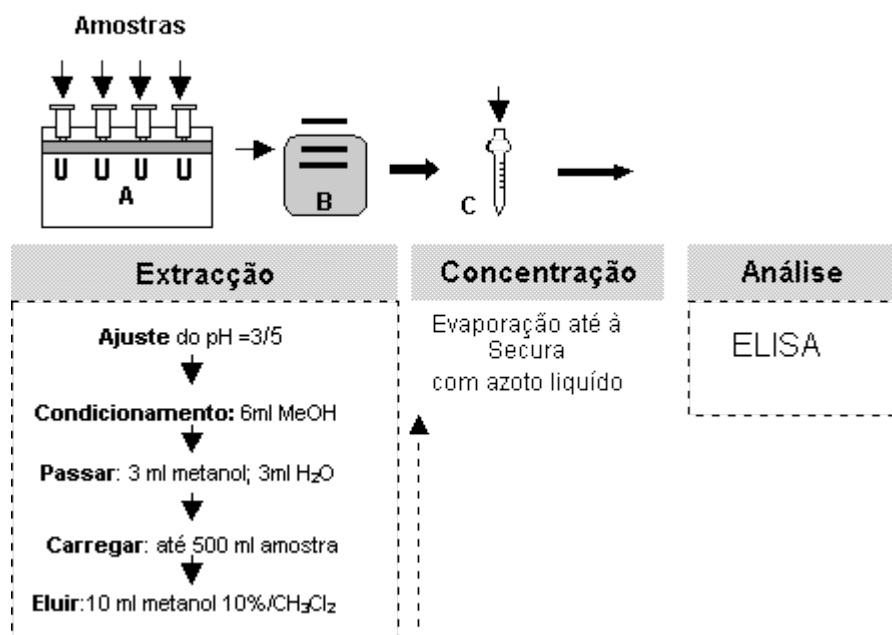


Figura 3 – Esquema do processamento e análise de amostras

O teste ELISA baseia-se numa reacção de competição entre um anticorpo monoclonal específico e o composto a analisar. Nesta reacção, a superfície dos poços encontra-se revestida por uma proteína (anticorpo monoclonal), que se liga exclusivamente com o EDC (antigénio) em análise. O EDC em estudo presente nas amostras analisadas e o conjugado (antigénio – enzima), (EDC marcado com uma enzima que ao reagir muda de cor), foram previamente misturados e adicionados aos poços da microplaca, ocorrendo então uma reacção de competição devido ao número limitado de ligações ao anticorpo.

Em seguida, o excesso de conjugado, e o EDC, que não reagiu, foram removidos dos poços através de uma solução de lavagem (PBS – Tween). Posteriormente, adicionou-

se a cada poço um substrato cromogénico, de modo a desenvolver cor, quando na presença do conjugado da enzima. A quantidade deste ligado ao anticorpo determinou a intensidade da cor, que por sua vez foi quantificada através da absorvância utilizando para o efeito um leitor ELISA (BIORAD – BENCHMARK).

A quantificação dos EDC's, foi realizada através de curvas de calibração (para cada EDC), também denominadas de curva de dose / resposta , através da determinação da absorvância a 450nm de padrões dos EDC's, com concentrações conhecidas. A concentração de EDC's em cada amostra foi determinada através da medição da intensidade de absorvância.

Para a análise através de LC-MS-MS, a extracção de BPA, 17 $\beta$  Estradiol e APE, foi efectuada utilizando colunas OASIS HLB 3cc da Waters, sendo eluídas com 2 x 5.0 ml de metanol.

O método de análise através de LC-MS-MS consiste num amostrador automático (HP 1100; LC binary pump - HP 1090) da Hewlett Packard (Palo Alto, CA, USA), com uma coluna de fase reversa - C<sub>18</sub> (5- $\mu$ m, 250 x 4 mm - LiChrospher 100 RP-18) e uma pré-coluna (4 x 4 mm, 5- $\mu$ m - Merck - Darmstadt, Germany). O volume de injeção foi ajustado para 25  $\mu$ L a um caudal de 1 mL/min.

A detecção foi realizada através de um detector HP 1040 M diode array UV-Vis acoplado em série com um detector selectivo de massa - LC-MSD HP 1100, equipado com uma fonte de ionização de pressão atmosférica, que pode ser utilizada para ionização química com pressão atmosférica (APCI) ou através de interface de electrospray (ESI).

A análise quantitativa foi realizada através de “selected ion monitoring (SIM), usando uma calibração externa. As curvas de calibração foram construídas através de regressão linear. A confirmação da identidade dos compostos presentes no efluente foi efectuada através de “scan mode”, comparando o tempo de retenção e o espectro de massa do composto analisado com o respectivo padrão.

Para a determinação de alguns parâmetros físico-químicos, (temperatura, pH, oxigénio dissolvido, Sólidos Suspensos Totais (SST), Sólidos Suspensos Voláteis (SSV), Carência Química de Oxigénio (CQO), Azoto Total), foram utilizadas as técnicas laboratoriais descritas no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 1992).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

No Quadro 1, apresentam-se as concentrações dos EDCs seleccionados, nos diversos pontos de amostragem ao longo da linha de tratamento. As análises, realizadas através de LC-MS/MS, revelaram níveis apreciáveis de APEs à entrada da linha de tratamento. No entanto, verifica-se uma redução substancial ao longo dos órgãos de tratamento da ETAR, o que pressupõe uma boa eficiência de remoção por parte dos órgãos que constituem a referida estação.

No entanto, segundo a literatura científica, os teores de APEs detectados no efluente tratado são suficientes para provocar desregulação endócrina nos organismos vivos (Sumpter, 1998). Ainda assim, poderá considerar-se que o efeito de diluição das águas estuarinas sobre o efluente tratado poderá neutralizar o potencial estrogénico do efluente.



No Quadro 1 mostram-se as concentrações de EDCs em alguns pontos-chave da linha de tratamento da ETAR, analisados através de LC-MS/MS.

Quadro 1: concentrações de EDCs em alguns pontos-chave da linha de tratamento da ETAR.

<b>Pontos amostragem</b>	<b>APEs (µg/l)</b>	<b>BPA (µg/l)</b>	<b>17β-estradiol (ng/l)</b>
Pós-gradagem	<b>78,15</b>	<b>1,55</b>	<b>&lt;ld</b>
Pós-desarenação	<b>55,02</b>	<b>0,15</b>	<b>&lt;ld</b>
Pós-filtração	<b>15,53</b>	<b>0,31</b>	<b>&lt;ld</b>
Efluente final – UV	<b>5,20</b>	<b>&lt;ld</b>	<b>&lt;ld</b>

Legenda: <ld (abaixo do limite de detecção)

Os extractos das amostras recolhidas em cada um dos pontos de amostragem do processo de tratamento da ETAR foram também analisados através de ELISA (Quadro 2).

Quadro 2– Resultados das amostras obtidos através de ELISA

<b>Pontos de amostragem</b>	<b>APEs (µg/l)</b>	<b>BPA (µg/l)</b>	<b>17β-estradiol (ng/l)</b>
Pós-gradagem	<b>&gt;ld</b>	<b>1,02</b>	<b>1,12</b>
Pós-desarenação	<b>Int.</b>	<b>0,21</b>	<b>1,12</b>
Pós Decantação Primária	<b>5,77</b>	<b>1,32</b>	<b>1,73</b>
Lamas Primárias	<b>0,724</b>	<b>&gt;ld</b>	<b>1,38</b>
Lamas secundárias	<b>&gt;ld</b>	<b>1,32</b>	<b>0,57</b>
Pós Decantação Secundária	<b>9,73</b>	<b>&gt;ld</b>	<b>1,38</b>
Pós-filtração	<b>5,77</b>	<b>0,55</b>	<b>0,91</b>
Efluente final – UV	<b>5,32</b>	<b>0,08</b>	<b>0,91</b>

Legenda: Int. (interferencia); > ld (acima do limite de detecção)

Ainda que não seja possível comparar em rigor os valores obtidos por LC-MS/MS com os de ELISA, uma vez que, para além de serem técnicas analíticas substancialmente diferentes em termos analíticos, a técnica de ELISA baseia-se numa metodologia ainda em aperfeiçoamento. Para além disso, encontra-se sujeita a algumas interferências com outros compostos, levando a que exista uma tendência para se obterem resultados sobre estimados (Goda *et al.*, 2000). Com efeito, a interferência analítica é devido a uma selectividade limitada dos anticorpos utilizados, sendo referida como “reação-cruzada”, um fenómeno comum a todos os imunoensaios (Oubina *et al.*, 1997).

A razão para a obtenção de resultados de 17 $\beta$ -estradiol através de ELISA tem a haver com o facto desta técnica ser mais sensível para este composto e por conseguinte apresentar limites de detecção mais baixos. Para além disso, o volume de amostra necessário para analisar o 17 $\beta$ -estradiol, era o ideal para a técnica de ELISA, mas reduzido para LC-MS/MS. Assim, o facto deste composto não ter sido detectado por LC-MS/MS não significa que este não esteja presente.

Contudo, apesar das diferentes técnicas analíticas utilizadas e da dificuldade em comparar os valores absolutos obtidos, ambas as técnicas mostram a presença e identificam compostos EDCs ao longo da linha de tratamento da ETAR.

Ainda que os métodos não possam ser adequadamente comparados, os teores de BPA obtidos através das duas técnicas mostram-nos que este composto é eficientemente removido, não sendo por isso de esperar que provoque efeitos adversos sobre o ambiente.

No Quadro 3, indicam-se os valores médios relativos aos parâmetros físico-químicos determinados. Sabe-se que a variação destes parâmetros ao longo do tempo poderá

influenciar a biodegradação e consequentemente a concentração de EDCs ao longo da linha de tratamento. (Gomes and Lester, 2003).

Quadro 3 - parâmetros físico-químicos determinados (valores médios).

Ponto	pH	O <sub>2</sub> dis.(mg/l)	SST (mg/l)	SSV (mg/l)	CQO Sol. (mg/l).	CQO br. (mg/l).	Temp. (°C)
1	7,68	0,2228			148,19	375,73	23,072
2	7,68	0,2520			146,37	381,31	22,996
3	7,53	0,2568			137,17	258,71	22,792
4	6,62		46,12	36,52	378,78	18097,38	22,916
5	7,09	3,6388			20,81	44,29	23,480
6	6,94		2239,00	1504,00	29,97	5514,93	24,148
7	7,10	4,5964	20,86	15,76	17,31	24,36	23,384
8	7,15	5,0096			18,06	26,68	23,372

## CONCLUSÕES

Os EDCs previamente seleccionados foram detectados ao longo da linha de tratamento. O efluente analisado é descarregados para o estuário do Tejo, encontrando-se alguns destes compostos em concentrações suficientes para poderem causar efeitos fisiológicos adversos ao nível do biota como foi mostrado através dos resultados. Contudo, é necessário ter em conta o efeito de diluição da massa de água estuarina que poderá reduzir ou neutralizar a acção destes compostos e consequentemente a disponibilidade para o biota. Por outro lado, é ainda necessário considerar que poderão existir outros compostos EDCs, não analisados, descarregados também para o referido estuário.

Os resultados mostram ainda, que os Kits ELISA podem ser utilizados em programas de monitorização para a detecção, mas não quantificação, de EDCs, tendo em conta as interferências e “reacções-cruzadas” que tendem a sobre-estimar os resultados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arukwe, A., Thibaut, R., Ingebrigsten, K., Celius, T., Goksoyr, A., Cravedi, J-P. (2000). In vivo an in vitro metabolism and organ distribution of nonylphenol in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquatic Toxicology*, 49 (249), 289-304.

Alda, M.J.L., and Barceló, D. 2001. Review of analytical methods for the determination of estrogens and progestogens in waste waters. *FRESENIUS JOURNAL OF ANALYTICAL CHEMISTRY*, 371 (4): 437-447.

Cespedes, R., Petrovic, M., Raldua, D., Saura, Ú., Pina, B., Lacorte, S., Viana, P., Barceló, D. 2004. Integrated procedure for determination of endocrine-disrupting activity in surface waters and sediments by use of the biological technique recombinant yeast assay and chemical analysis by LC-ESI-MS. *Anal. Bioanal. Chem.*, 378 : 697-708.

Desbrow, C., Routledge, E.J., Brighty, G.C., Sumpter, J.P., Waldock, M.J. (1998). Identification of estrogenic chemicals in sewage treatment works effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environ. Sci. Technol.* 32, 1549-1558.

Goda, Y., Kobayashi, K., Fukuda, S., Fujimoto, M., Ike, M. And Fujita, M. (2000). Development of the ELISAs for detection of hormone-disrupting chemicals. *Water Science and Technology*, 42 (7-8), 81-88.

Gomes, R.L. and Lester, J.N. (2003). Endocrine Disruptors in Receiving Waters. *Endocrine Disruptors in Wastewater and sludge treatment processes*. Ed. J. W. Birkett and J. N. Lester, CRC Press (Florida and IWA Publishing (London). Chpt. 6, pp. 177 – 217.

Nichols, K.M., Snyder, E.M., Snyder, A., Pierens, S.L., Miles-Richardson, S.R. and Giesy, J.P. 2001. Effects of nonylphenol ethoxylate on reproductive output and bioindicators of environmental estrogen exposure in fathead minnows, *Pimephales promelas*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol.20,Nº3, 510-522.

Oubina, A., Gascón, J., Barceló, D. (1997). Multianalyte effect in the determination of cross-reactivities of pesticide immunoassays in water matrices. *Analytica Chimica Acta*, 347, 121-130.

Petrovic M. E., Eljarrat, Lopez de Alda, M.J., Barcelo, D. 2004. Endocrine disrupting compounds and other emerging contaminants in the environment: A survey on new monitoring strategies and occurrence data. *Anal. Bioanal. Chem.* 378 : 549-562

Tyler, C.R., Jobling, S., and Sumpter, J.P., 1998. Endocrine disruption in wildlife: A critical review of the evidence. *Critical Rev. in Toxicol.* 28 (4), 319-361.

Tsuda, T., Suga, K., Kaneda, E., Ohsuga, M. 2000. Determination of 4-nonylphenol monoethoxylate, Nonylphenol diethoxylate and other alkylphenols in fish and shellfish by high-performance liquid Chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 746, 305-309.

Sumpter, J.P. (1997). Environmental control of fish reproduction: A different perspective. *Fish Physiol. and Biochem.* vol. 17, no. 1-6, pp. 25-31.

Sumpter, J.P. (1998). Xenoendocrine disrupters - environmental impacts. *Toxicol. Lett.* 102-103, 337-342.

#### **4.4. AVALIAÇÃO DA REMOÇÃO DE COMPOSTOS DISRUPTORES ENDÓCRINOS PRESENTES NAS ÁGUAS RESIDUAIS URBANAS**

## **Avaliação da remoção de compostos disruptores endócrinos presentes nas águas residuais urbanas**

**R. Maurício**, M. Diniz, E. Mateus, L. Amaral, I. Peres,  
L. Castro, F. Santana.

### **RESUMO**

O trabalho tem por objectivo o estudo da cinética de biodegradação (aeróbia e anaeróbia) de compostos disruptores endócrinos, por forma a avaliar condições e mecanismos determinantes para aquele processo, bem como os aspectos relacionados com a sua remoção por separação sólido/líquido (Figura 1).

O impacto de compostos xenobióticos no meio aquático tem gerado graves modificações nos ecossistemas, nomeadamente o desequilíbrio das populações relativamente à sua composição (machos/fêmeas) associado ao efeito de compostos disruptores endócrinos, cujas consequências não são ainda previsíveis.

Os mecanismos de remoção (em estações de tratamento de águas residuais, ETARs) ou as vias de transferência de compostos disruptores endócrinos (ED's) através de fontes de poluição difusa para o meio aquático são pouco conhecidas, embora estes aspectos constituam factores chave para a reversão de efeitos nos ecossistemas aquáticos.

A presente comunicação tem por objectivos divulgar um projecto recentemente iniciado e os seus resultados preliminares. Este projecto visa o estudo de impactes de ED's presentes em águas residuais urbanas através do conhecimento da capacidade

de remoção associada aos processos de tratamento comumente utilizados e da avaliação de potenciais efeitos provocados pelas descargas respectivas (líquidas e sólidas). Ao nível do tratamento de águas residuais urbanas pretende-se estudar essencialmente os aspectos relacionados com a cinética de degradação de ED's nos processos biológicos e a sua remoção por separação sólido/líquido.

No que respeita ao tratamento biológico, serão estudadas as cinéticas de degradação aeróbia e anaeróbia, à escala laboratorial, por forma a identificar as condições de operação que maximizam a remoção daqueles compostos. A separação promovida por sedimentação será avaliada considerando a influência da adsorção às partículas e à remoção da fase particulada associada a estes compostos

Os resultados preliminares obtidos revelam que é efectiva a remoção de nonilfenol (NP) na Estação de Tratamento de Águas Residuais de Chelas (ETAR). Verificou-se uma diminuição significativa (> 95%) da concentração deste composto ao longo da linha de tratamento da ETAR, reduzindo, por isso, os potenciais efeitos que poderia causar no ambiente.

## **INTRODUÇÃO**

Nos últimos 50 anos, alguns compostos sintéticos como os APEOs e PCB's, foram largamente utilizados em variadas aplicações industriais, comerciais e domésticas, sendo parte deles libertados no meio aquático. Alguns destes compostos xenobióticos, presentes em efluentes e lamas industriais, são estrogénicos (tais como o NP, outros derivados de alquilfenóis, PCB's, dietil-etoxilatos, etc.), e podem induzir alterações nas funções endócrinas de peixes e outros organismos, nomeadamente o desequilíbrio das populações relativamente à composição (macho / fêmea).



Por este motivo, existe actualmente uma preocupação crescente sobre o uso indiscriminado destes compostos, principalmente devido à relativa estabilidade de alguns metabolitos de degradação de produtos contendo APEOs, gerados durante os processos de tratamento de águas residuais (Blackburn e Waldock, 1995).

Está já demonstrado que o NP é tóxico, tanto para espécies de água doce como para espécies marinhas, induzindo respostas estrogénicas na truta macho e revelando efeitos de bioacumulação em organismos de água doce (Manahan, 1992; Jobling e Sumpter, 1993; Purdom *et al.*, 1994). Assim, é cada vez maior a convicção de que estes compostos sintéticos podem constituir potenciais disruptores endócrinos (ED's).

Apesar de elevadas descargas nos meios receptores e da sua potencial toxicidade, a informação disponível é ainda muito limitada, relativamente ao efeito dessas descargas nos meios receptores, nomeadamente, em sistemas aquáticos.

Por outro lado, é também muito escassa a informação sobre remoção de ED's em estações de tratamento de águas residuais, circunstância que impede a realização de estimativas de balanços materiais, indispensáveis à previsão dos correspondentes impactes nos meios hídricos.

Para uma correcta interpretação dos riscos ambientais associados a estes compostos há que efectuar uma aproximação integrada envolvendo todas as formas de produção destes compostos, desde ETARs aos solos, às reservas de águas e da sua relação com os indivíduos expostos.

Qualquer tipo de análise da poluição da água provocada por compostos orgânicos inclui uma avaliação da sua biodegradação nos meios receptores ou nas ETARs. Para

analisar a biodegradação destes compostos tendo em conta as quantidades presentes nas águas residuais (sendo significativas ou negligenciáveis) é necessário avaliar de uma forma global o seu comportamento associado à sua utilização para que desta forma seja mais fácil estimar o seu comportamento nos sistemas aquáticos.

A biodegradação é um processo muito importante para a remoção de poluentes orgânicos, minimizando os efeitos negativos dos ED's no ambiente. A remoção ocorre através da transferência física para o ar, para as lamas e através de transformações bioquímicas. É necessária uma revisão dos processos de remoção em bio-reactores, analisando os mecanismos envolvidos e as suas cinéticas de biodegradação no que concerne à eficiência de remoção dos ED's nas ETARs

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

A realização do trabalho adoptará uma metodologia baseada em fases, como a seguir é indicado.

- Fase A - Pesquisa bibliográfica

Para a preparação das fases seguintes, efectuar-se-á uma pesquisa bibliográfica, através da análise e discussão de informação existente.

- Fase B- Desenvolvimento e afinação de técnicas laboratoriais

Nesta fase serão desenvolvidas e testadas diversas técnicas laboratoriais para identificação e quantificação da presença de compostos disruptores endócrinos presentes quer na fase solúvel, quer na biomassa das estações de tratamento de águas residuais urbanas

- Fase C- Screenings” de ED’s

Campanha de amostragem numa estação de tratamento de águas residuais (ETAR de Chelas/Lisboa), por forma a fazer um “screenings” de ED’s em águas residuais numa ETAR. Com esta campanha pretende-se identificar os principais ED’s presentes ao longo da linha de tratamento de uma ETAR (Figura 1). Para além dessa identificação pretende-se igualmente quantificar, pelo menos quatro compostos (NP, octilfenol, 17 $\beta$  estradiol e bisfenol A).

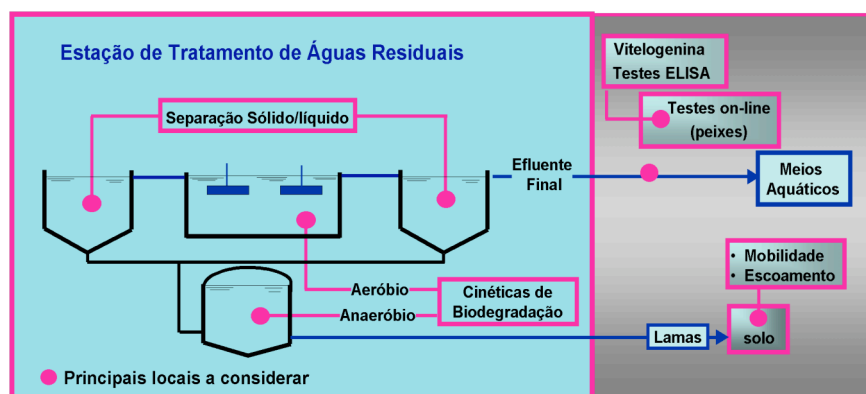


Figura 1 – Avaliação do balanço de massa dos ED’s numa ETAR

- Fase D – Estudo da remoção de compostos disruptores endócrinos por adsorção nas lamas das estações de tratamento de águas residuais urbanas.

Os estudos de remoção por adsorção serão efectuados em colunas de sedimentação, simulando as condições operacionais (cargas hidráulicas e tempos de retenção) existentes em tanques de sedimentação.

Serão utilizadas águas residuais provenientes de uma ETAR, eventualmente adicionadas com ED’s (dependendo dos níveis encontrados na Fase C) O teor de ED’s será analisado na fase líquida e na fase sólida.

- Fase E – Estudo da cinética de biodegradação de compostos disruptores endócrinos

Os estudos de biodegradabilidade de ED's (nonilfenol, octilfenol, 17 $\beta$  estradiol e bisfenol A) serão realizado sob condições aeróbias e anaeróbias, a dois níveis:

- em reactores batch: ensaios preliminares para determinação da cinética de biodegradação destes compostos utilizando biomassa adaptada e não adaptada ao substrato. Serão consideradas diferentes concentrações de disruptores endócrinos para ensaios individuais e para ensaios onde será utilizada uma mistura destes compostos. Para avaliar a o efeito das condições ambientais na degradação dos compostos estrogénicos serão utilizados reactores batch anaeróbios.

Serão realizados também, ensaios de comparação, em condições aeróbias, utilizando como inóculo lamas de estações de tratamento de águas residuais. Nos ensaios anaeróbios, para além da fase líquida e da biomassa, será igualmente monitorizada a fase gasosa.

- em reactores à escala laboratorial: reactores em modo semi-contínuo, para quatro tempos diferentes de retenção de sólidos e também para diferentes cargas iniciais de ED's. Estes ensaios irão fornecer os dados sobre o grau de remoção dos diferentes compostos sob diversas condições de operação, no sentido de otimizar o tratamento dos mesmos em estações de tratamento à escala real. Serão realizados ensaios respirométricos para estimar os parâmetros cinéticos “existentes”.

#### - Fase F – Modelação

Com os resultados da fase precedente, procurar-se-à propor um modelo básico de biodegradação de compostos disruptores endócrinos, o qual deverá constituir

informação relevante para a operação de estações de tratamento de águas residuais, designadamente para se maximizar a remoção daqueles compostos.

## Desenvolvimento da Fase C

### Análise de NP em Águas Residuais

O presente estudo foi desenvolvido na ETAR de Chelas / Lisboa, que apresenta um caudal médio diário anual de aproximadamente 49 000 (m<sup>3</sup>/dia), processando, principalmente águas residuais urbanas, atendendo uma população de cerca de 211 000 habitantes (Emarliz). Os pontos de amostragem encontram-se identificados na Figura 2.

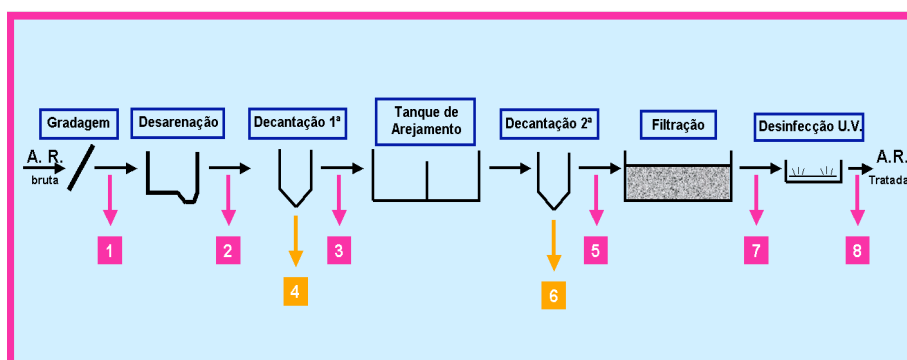


Figura 2 – Linha de tratamento da ETAR de Chelas (fase líquida)

### Recolha e Processamento das Amostras de Águas Residuais

As amostras de águas residuais foram recolhidas na ETAR durante o mês de Junho de 2001, abrangendo períodos diários de 16 horas (das 8 às 24 horas) durante uma semana. As amostras foram transportadas para o laboratório em malas térmicas refrigeradas, sendo em seguida filtradas (Macherey-Nagel, MN GF –3, porosidade de 0,60 µm).

Posteriormente procedeu-se à extração dos compostos presentes nas amostras. Esta foi efectuada utilizando colunas com duas fases (liChrolut RP – 18 (40-63 $\mu$ m ) e liChrolut EN (40-120 $\mu$ m), e eluídas com 2 x 5.0 ml de acetona (a 100%), segundo um método baseado em Stumpf *et al.* (1996) e descrito por Weltin *et al.* (1998).

Em virtude das pequenas quantidades destes compostos, procedeu-se a uma concentração das amostras (até 1 ml), com azoto líquido à temperatura ambiente, de modo a facilitar a leitura por HPLC

### **Determinação do NP**

Foi utilizado um sistema de HPLC (Merck-Hitachi, L-6200A), utilizando uma coluna (Merck) de 4.0 x 125mm, Licosphere RP18 (5 $\mu$ m). equipado com detector de fluorescência (Merck-Hitachi, F-1050). As condições de operação do detector de fluorescência foram as seguintes: Ex 275 nm, Em 300 nm; temperatura da coluna, 40°C; flow-rate 1,0 ml/min.; fase móvel, A= água (ultrapura), B= acetonitrilo: gradiente linear.

## **RESULTADOS**

Uma vez que a informação sobre remoção de ED's em estações de tratamento de águas residuais (ETAR's) é muito escassa, realizou-se uma campanha de amostragem à Estação de Tratamento de Águas Residuais de Chelas, (linha de tratamento da fase líquida esquematizada na figura 2) onde se analisaram as concentrações de NP ao longa da referida estação.

Assim, através da análise em HPLC, verificou-se que a concentração de NP diminui ao longo da ETAR, (quadro 1 e figura 3 ), o que pressupõe alguma eficiência de remoção por parte dos órgãos que constituem a referida estação.

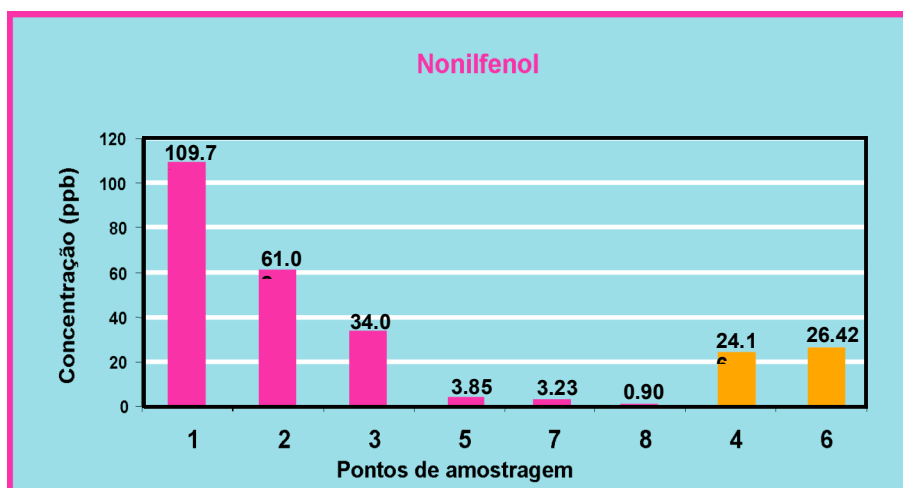


Figura 3 – Evolução da concentração de NP ao longo da ETAR

## CONCLUSÕES

O objectivo deste projecto é significativamente relevante para avaliação dos impactes ambientais, uma vez que inclui o estudo dos mecanismos de remoção ou biodegradação dos ED's (descarga de efluentes) bem como das condições para melhorar a eficiência de remoção destes compostos nas ETARs.

A informação dos impactes dos ED's nos rios europeus é bastante alarmante, com desequilíbrios drásticos (machos / fêmeas) nas populações de peixes.

Este projecto pretende contribuir para a minimização deste problema, dando principal ênfase a uma das principais vias de transporte desses poluentes, que são as águas residuais urbanas.

## BIBLIOGRAFIA

Blackburn, M.A., Waldock, M.J., 1995. Concentrations of alkylphenols in rivers and estuaries in England and Wales. *Wat. Res.* 29 (7), 1623 – 1629.

Jobling, S., Stumpter, J.P., Detergent components in sewage effluent are weakly estrogenic to fish: an in vitro study using rainbow trout (*Aquat. Toxicol.* 27 (1993) 361.

Jobling, S., Sumpter, J.P., 1993. Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: an in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquat. Toxicol.* 27, 361 – 372.

Manahan, S.E. (Ed) 1992 – *Toxicological Chemistry*. 2nd ed. Lewis Publishers, INC, USA. Pp 449.

Purdom, C. E., Hardiman, P.A., Bye, V.J., Eno, N. C., Tyler, C. R. and Sumpter, J.P. 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem. Ecol.* 8: 275-285.

Stumpf, M., Ternes, Th.A., Haberer, K., And Baumann, W.: Nachweis von natürlichen und synthetischen Östrogenen in Klaranlagen und Fließgewässern. *Vom Wasser* 87: 251-261, 1996.

Weltin, D., Mateus, E., Bilitewski, B., And Santana, F. (1998). Measurement of Endocrine Disrupting compounds in sewage treatment plants and sewage sludges. In “European Conference on the Sustainable Development and Quality of Water & European Workshop on Environmental Technologies ‘98”. Nancy, France, 6-10 October.



**4.5. SCREENING ENDOCRINE DISRUPTORS COMPOUNDS IN A PORTUGUESE  
WASTEWATER TREATMENT PLANT USING ENZYME LINKED IMMUNOASSAY  
(ELISA).**

## **Screening Endocrine Disruptors Compounds in a Portuguese Wastewater Treatment Plant using Enzyme Linked Immunoassay (ELISA).**

**Maurício, R.,** Diniz, M., Amaral, L., Peres, I., Santana, F. (2003)

### **ABSTRACT**

Anthropogenic compounds that are able to disrupt the endocrine systems of wildlife species are a major cause for concern and lead to a demand for new screening methods. The presence and quantification of EDCs (Endocrine Disruptor Compounds) at different wastewater treatment stages is of major interest to identify endocrine activity of wastewater treatment plants (WWTPs) discharges to the environment. This study consists in a preliminary survey of concentrations of previously selected EDCs, undertaken to establish environmental concentrations to support a biological program assay exposing freshwater fish, evaluate removal efficiency at different stage wastewater treatment processes and study the kinetics of bioremoval of EDCs under aerobic/anaerobic conditions in order to achieve information for the optimization removal in the WWTPs. Selected endocrine disrupting chemicals (APEs, BPA and 17 beta-estradiol) were measured in samples from a WWTP located in Lisbon (Portugal), using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit developed by Takeda Industries Ltd. The sample treatment method involved a solid phase extraction step using Oasis HLB (Waters) cartridges from wastewater and sludge samples. Sub-samples were also taken and analyzed by LC-MS-MS. A short consideration is made concerning ELISA and LC-MS-MS methods and results obtained by these two methods are also under discussion. The results show that after treatment EDCs are still present in the effluent and sludge at environmental relevant levels and vary along the different wastewater treatment stages process.

**KEYWORDS:** EDCs, Wastewater, ELISA, screening, LC-MS-MS

## INTRODUCTION

In the last decade there have been an increasing concern about a group of chemical compounds with endocrine activity, which are present in aquatic environment, and that are able to cause adverse effects on reproduction of humans and wildlife species (Korner *et al.*, 1998). Many reported effects were related with several classes of chemical compounds such as pesticides, aromatic compounds, alkylphenols, phytoestrogens and natural estrogens present in wastewater effluent. For that reason is of major importance the identification and quantification of these endocrine disruptors compounds (EDCs).

However the identification and quantification using the traditional analytical methods (e.g. GC-MS, LC-MS-(MS), HPLC) are difficult, expensive, time consuming and demand the development of specific procedures to analyse these compounds in complex environmental samples. Therefore, there is a strong need for fast, simple, and cost-effective methods for quantitative analysis of EDCs, such as ELISA (Goda *et al.*, 2000).

The main objective of this study was to test a novel ELISA Kit developed by Takeda Chemical Industries (Japan) in order to identify the presence and quantify a group of previously selected EDCs in a wastewater effluent from Lisbon (Portugal). Additionally, we intended to discuss results with data obtained from sample analysis using LC-MS-MS.

## MATERIALS AND METHODS

Wastewater samples were filtered with a glass-fiber filter of one-micrometer pore size (Macherey – Nagel, Germany). For ELISA analysis, the EDCs were extracted from water using OASIS HLB 3cc solid phase extraction (SPE) column (Waters). Prior to extraction, the columns were conditioned with methanol and water. The EDCs were eluted 2x5ml of dichloromethane or methanol (10%), (depending the EDCs in analysis) and concentrated under gentle stream of nitrogen gas.

The Elisa kit, the technique and the protocols used were developed by Takeda Chemical Industries (Japan). The ELISA test is based in competitive reaction between a specific monoclonal antibody and the analysed compound (Goda *et al.* 2000). The inner surface of each well is coated with the protein called monoclonal antibody, which binds exclusively with EDC compound (antigen). The EDC derived from samples and an antigen-enzyme conjugate, i.e. EDC labeled with a coloring enzyme, are premixed and added into each microplate well for a competitive assay, vying for a limited number of antibody binding sites. When the EDCC concentration is higher relative to the enzyme conjugate's, the EDC will predominantly bind antibody and vice versa.

The standard curve, a dose-response curve from known concentrations of EDCC standards, is determined from the absorbance at 450nm. The EDC concentration in each sample is accurately calculated from the response intensity of absorbance.

The LC-MS-MS method used was development by Petrovic *et al.* (2002). The HPLC system consisted of an HP 1100 autosampler and an HP 1090 A LC pump (Hewlett

Packard, Palo Alto, CA, USA). Chromatographic separation was performed using a reversed-phase C18 analytical column (LiChrospher 100 RP18) of 250 x 4 mm and 5- $\mu$ m particle diameter preceded by a guard column (4 x 4 mm, 5- $\mu$ m) of the same packing material from Merck (Darmstadt, Germany) The injection volume was set at 25  $\mu$ l and the flow-rate was 1 ml / min. Detection was carried out using an HP 1040 Mdiode-array UV–Vis detector coupled in series with an LC-MSD HP 1100 mass-selective detector, equipped with an atmospheric-pressure ionization source and electrospray (ESI) interface. Quantitative analysis was performed in a selected ion monitoring (SIM) mode using external calibration. To check the influence of ion suppression on the MS detection of target compounds, 4-heptylphenol was used as an internal standard for NI mode.

## DISCUSSION AND RESULTS

Table 1 and 2 – EDC show results from ELISA (1) and LC-MS-MS (2)

Table 1 – EDC Results by ELISA in samples

Sample points	APEs ( $\mu$ g/l)	BPA ( $\mu$ g/l)	17 $\beta$ -estradiol (ng/l)
After - Screening	>Id	1,02	1,12
After - Grit Removal	Int.	0,21	1,12
After - 1 <sup>st</sup> sedimentation	5,77	1,32	1,73
Primary Sludge	0,724	>Id	1,38
Secondary Sludge	>Id	1,32	0,57
After - 2 <sup>nd</sup> sedimentation	9,73	>Id	1,38
After - filtration	5,77	0,55	0,91
Final effluent – UV	5,32	0,08	0,91

Table 2 – EDC Results LC-MS-MS

<b>Sample points</b>	<b>APEs (µg/l)</b>	<b>BPA (µg/l)</b>	<b>17β-estradiol (ng/l)</b>
After - Screening	<b>78,15</b>	<b>1,55</b>	<b>&lt;ld</b>
After - Grit Removal	<b>55,02</b>	<b>0,15</b>	<b>&lt;ld</b>
After - 1 <sup>st</sup> sedimentation			
Primary Sludge			
Secondary Sludge			
After - 2 <sup>nd</sup> sedimentation			
After - filtration	<b>15,53</b>	<b>0,31</b>	<b>&lt;ld</b>
Final effluent – UV	<b>5,20</b>	<b>&lt;ld</b>	<b>&lt;ld</b>

Regarding 17β-estradiol and BPA, ELISA assay showed, in some samples, overestimated results in comparison with data obtained by LC-MS-MS which could be due to the broader cross-reactivity with other analytes, as pointed out by Goda *et al.* (2000). However, LC-MS-MS results for APE were higher than in ELISA which is not in agreement with other studies and can not be easily explained.

Although ELISA results could not be considered as absolute values, mainly due to the interferences, it can give an idea concerning the presence and quantity of the selected EDCs. Moreover allow quicker procedure and small sample values with low detection limits and acceptable costs (Goda *et al.*, 2000).

Our results also support that ELISA can be used for environmental monitoring of EDCs but caution is need in interpretation and discussion of the results as consequence of several interferences that may occur influencing the final values. This study shows that more tests are needed for a better knowledge of ELISA data and compare it with traditional analytical methods.

## REFERENCES

Goda, Y., Kobayashi, K., Fukuda, S., Fujimoto, M., Ike, M. And Fujita, M. (2000). Development of the ELISAs for detection of hormone-disrupting chemicals. *Water Science and Technology*, 42 (7-8), 81-88.

Petrovic, M., Diaz, A., Ventura, F., and Barceló, D. (2001) Simultaneous Determination of Halogenated Derivatives of Alkylphenol Ethoxylates and their Matabolites in Sludges, Rives Sediments, and Surface, Drinking, and Wastewaters by Liquid Chromatography – Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 73, 5886-5895.

Petrovic, M., Eljarrat, E., Alda, M.J.L., Barceló, D. (2002) Recent advances in the mass spectrometric analysis related to endocrine disrupting compounds in aquatic environmental samples in *Journal of Chromatography A* – In Press Petrovic, M.,

Barceló, D. (2001), Review of Advanced Sample Preparation Methods for the Determination of Alkylphenol Ethoxylates and Their Degradation Products in Solid Environmental Matrices. Presented at: Workshop “Analysis, toxicity and biodegradation of organic pollutants in groundwater from contaminated land, landfills and sediments”, held in Barcelona, Spain, 8-10 November 2001.

#### **4.6. ASSESSING THE ESTROGENIC POTENCY IN A PORTUGUESE WASTEWATER TREATMENT PLANT - A MULTI-LEVEL APPROACH**



# ASSESSING THE ESTROGENIC POTENCY IN A PORTUGUESE WASTEWATER TREATMENT PLANT - A MULTI-LEVEL APPROACH

Mário S. Diniz, **Rita Maurício**, Mira Petrovic, López de Alda , Leonor Amaral, Isabel  
Peres , Jean C. Pihan, Damiá Barceló, and Fernando Santana

## ABSTRACT

The estrogenic potency of a Waste Water Treatment Plant (WWTP) was carried out using chemical and biological analyses, which show that after the station treatment processes some of the most common endocrine Disruptor Compounds (EDCs) are still present in the treated effluent. Male goldfish (*Carassius auratus*) were used as biological indicators in a 28-day experiment. Vitellogenin, gonadosomatic and hepatosomatic indices, steroids (17 $\beta$ -estradiol and 11-Ketotestosterone) and histopathology were used to evaluate WWTP treated effluent estrogenicity, in combination with instrumental analyses. The results show a significant increase ( $P<0.01$ ) in plasma and liver Vtg, which were significantly correlated ( $r= 0.66$ ;  $P<0.01$ ). The gonadosomatic index was significantly ( $P<0.01$ ) reduced in exposed fish. The steroid analyses revealed significant elevations in 17 $\beta$ -estradiol and depressed 11-Ketotestosterone concentrations. The histological examinations show changes in exposed fish gonads, such as regressed testes and in a few cases the development of ovo-testis in fish exposed to 50% and 100% treated effluent.

## INTRODUCTION

There has been increasing awareness that a group of substances, usually termed endocrine disruptor compounds (EDCs), may negatively affect the endocrine system of wildlife and humans (1). These chemicals are discharged to the aquatic environment through point (sewage treatment, pulp mill and industrial effluent) and non-point (urban and agricultural runoff) sources (2).

These compounds, which are both natural and man-made, are able to mimic the action of natural steroids. The most intensively studied group of EDCs are environmental estrogens such as  $17\beta$ -estradiol (E2) and alkylphenols (APEs), which are common in sewage effluents (3). However, many other natural and synthetic chemicals are estrogenic and may cause endocrine disruption, e.g. bisphenol-A (BPA),  $17\alpha$ -ethynylestradiol (EE2), organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls, polynuclear aromatic hydrocarbons and phytoestrogens (4).

The alkylphenols are the final breakdown products of alkylphenol polyethoxylates (APEOs) and are widely used as detergent emulsifiers and emulsion agents in various domestic and industrial applications. Nonylphenol and octylphenol are the most representative breakdown metabolites of APEO degradation, showing higher toxicity to wildlife than the parent compounds (5).

The compound BPA is used in the production of epoxy resins and polycarbonate plastic for household and industrial applications and, therefore, can be expected to be present in wastewater (6).

Natural and synthetic steroids, such as E2 and EE2 respectively, are also found in wastewater effluents originating from human waste. They are very potent estrogens that can cause adverse effects in living organisms (7).

Vitellogenin (Vtg) is the main precursor of yolk protein in oviparous vertebrates and is synthesised by the liver in response to endogenous oestrogens (8). Vtg is normally synthesized in mature females, where the level of estrogen is above the threshold required to induce it and male and juvenile fish only produce background levels of this protein. However, upon exposure to estrogen or an estrogen mimic, they will be induced to synthesize Vtg, since they have the gene for it in their livers. (9). The potential of Vtg as a biomarker has already been demonstrated in various fish species (10; 11). Thus, Vtg has been used as an ideal biomarker for measuring the exposure of oviparous animals to estrogen or to estrogen-mimicking compounds (12).

Some studies have suggested that exposure to EDCs can alter the steroid concentrations in fish, e.g. the plasma 11-ketotestosterone (11-KT) and E2 concentrations, and deregulate their endocrine systems, therefore, the sex hormone balance has also been advocated as a reliable and complementary biomarker of potential reproductive disruption (13,14).

The main objective of this study was to assess the sewage discharge-related estrogenicity that could be observed at various levels of the biological organization of fish. In addition, quantification of the target endocrine chemicals in the Waste Water Treatment Plant (WWPT) effluent provided information on the persistence of these substances and is complementary to the bioassay data.

## **EXPERIMENTAL**

### **Selection of the wastewater treatment plant**

The Chelas WWTP is located in the east of Lisbon district (Portugal) and discharges its treated effluent into the River Tagus estuary. It consists of an interceptor system, which includes five pumping stations to collect downtown wastewater.

The WWTP was selected as a model to study as it receives great volumes of urban wastewater and variable quantities of industrial effluents produced by companies in the municipal district. It was designed to collect and treat 52,500m<sup>3</sup> of urban wastewater per day, corresponding to approximately 211,000 equivalent inhabitants. The WWTP provides secondary and tertiary treatment, with activated sludge treatment (including nitrogen and phosphorous removal) and final disinfection with an ultra-violet system before the effluent is discharged into the River Tagus estuary.

### **Sampling and Sample preparation**

At 4-hourly intervals over a 24-hour period, composite samples were collected in amber glass bottles from different sampling points of the WWTP. The procedure for sample pre-treatment and extraction was similar for ELISA (enzyme-linked immunoassay) and LC-MS-MS analysis and was carried out according to Petrovic *et al.* (15, 16). Briefly, wastewater samples (300 ml) were filtered in a glass-fibre filters (0.45 µm; Macherey – Nagel, Germany) and acidified with 1M acetic acid buffer (pH 5) to eliminate particulate matter and other suspended solid matter and then stored at 4 °C in the dark. The EDCs were extracted, within 24 hours of collection, using OASIS HLB 3cc solid phase

extraction (SPE) columns (Waters). Prior to extraction, the columns were conditioned with methanol and water. The EDCs were eluted with 2 x 5ml of dichloromethane (BPA and 17 $\beta$ -estradiol) or methanol (APEs), depending on the EDCs for analysis, and then evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen and reconstituted with 10% methanol to a final volume of 2 ml.

### **LC – MS – MS Analysis Conditions**

Alkylphenols (nonylphenol and octylphenol), alkylphenol ethoxylates (APnEO, nEO=1-15), bisphenol A (BPA) and estrogens (E1-estrone, E2-estradiol, E3-estriol, EE2-ethynyl estradiol, DES- diethylstilbestrol, E2-gluc., E1-sulf.) were analysed using the LC-MS-MS methods (17) and (18), respectively. LC-MS-MS analyses were performed on a Waters 2690 series Alliance HPLC (Waters, Milford, MA, USA) with a quaternary pump equipped with a 120-vial capacity sample management system. The analytes were separated on a 5 $\mu$ m, 125 x 2mm i. d. C18 reversed phase column Purospher® STAR RP-18 endcapped (Merck, Darmstadt, Germany). The sample injection volume was set at 10  $\mu$ l to APEs, APEOs and BPA and to 25  $\mu$ l to estrogens. A binary mobile phase gradient with methanol (A) and water (B) was used for analyte separation at a flow rate of 200 $\mu$ l/min. The elution gradient was linearly increased from 30% A to 85% A in 10 min, then increased to 95% A in 10 min and kept isocratic for 5 min.

A bench-top triple quadrupole mass spectrometer Quattro LC from Micromass (Manchester, UK) equipped with a pneumatically assisted electrospray probe and a Z-spray interface was used for this study. The capillary voltage was set at 2.8 kV, extractor lens at 7V and RF lens at 0.6V. The source and desolvation temperatures were 150°C and 350°C, respectively. The nitrogen (99.999% purity) flows were optimised at 50 l/h for the cone gas and 540 l/h for the desolvation gas. For MS-MS

experiments the argon collision gas was maintained at a pressure of  $5.8 \times 10^{-3}$  mbar. To measure estrogens the MS parameters were as follows: capillary voltage, 3 kV; source temperature, 150°C; desolvation temperature, 350 °C; extractor voltage, 4 V; and rf lens, 0.2 V. Nitrogen was used as both nebulizing and desolvation gas. The flow rate of the nebulizing gas was set at 60 L/h and that of the desolvation gas at 550 L/h. Argon was used as the collision gas with a pressure of  $2.49 \times 10^{-3}$  mbar.

Quantitative LC-MS-MS analysis of compounds detected under negative ionisation (NI) conditions (NP, OP, BPA and estrogens) was carried out in multiple reactions monitoring (MRM) mode, while compounds detected under positive ionisation (PI) conditions (NPEOs and OPEOs) gave only  $[M^+Na]^+$  adduct ions and produced no fragmentation. As a result these compounds were analysed using a single stage MS in selected ion monitoring (SIM) mode. The MRM and SIM ions, respectively, and the limits of detection (LODs) obtained can be seen in Table 1, supporting information.

## Biological Assays

A group of four fiberglass tanks (1m<sup>3</sup>) were set up at the WWTP, supplied with different concentrations of the treated wastewater effluent (25, 50 and 100%) produced by mixing different percentages of effluent with tap water (mains water previously de-chlorinated). One tank was supplied exclusively with tap water (the reference tank). All tanks received a continuous flow of water (8 L/min.) and aeration using an air pump.

To carry out the exposure experiments, sexually mature male goldfish (*Carassius auratus*), obtained from local producers (Aquário Vasco da Gama) and weighing an average of  $15 \pm 2$ g were used as a test organism in a semi-field assay.

Before the tests began, the fish were acclimated in a 300L glass aquarium at the laboratory for two weeks and fed with commercially available pellets (Tetra). To perform the exposure tests, they were randomly distributed in each tank (N=44) and fed daily with commercial pellets. Some physicochemical parameters (temperature, dissolved oxygen, pH and conductivity) were checked weekly. Cumulative mortality was registered as well.

Fish were exposed to various concentrations of wastewater effluent for four 28-day and at the end of the experiment they were sampled to collect blood from the caudal vein, using heparinized syringes (2cc) treated with aprotinin (10 TIU/ml). After centrifugation at 4,000xg (15 min. at 4°C), the blood plasma was immediately stored at -80°C in Eppendorf tubes, awaiting later analysis.

The vitellogenin analyses were carried out by the ELISA method described by Denslow *et al.*, (19). Briefly, microtiter (Nunc-Roskilde, Denmark) wells were coated with diluted (1: 200) male carp plasma samples (50 µl), in phosphate buffered saline (PBS) solution. The micro plate was incubated overnight at 4°C, washed and blocking buffer (10% BSA in PBS with 0.02% sodium azide) was added to each well. After incubation 2 hr at room temperature microplates were washed again. The carp monoclonal antibody (Biosense) diluted to an appropriate concentration (0.1-5 µg/ml) was added to each micro titer well and incubated 60 min at 38°C. Subsequently to new plate wash, a secondary antibody (1:1000) was added (goat-antimouse immunoglobulin-IgG conjugated to alkaline phosphatase, SIGMA-Aldrich) to plate wells and incubated (60 min at 38°C). After washing, the substrate (p-nitro-phenylphosphate – PNPP, SIGMA-Aldrich) was added (100 µl) to each microplate well, incubated at room temperature (10-30 min.) and stop solution (50 µl; 3N NaOH) added to stop the development process. The microplates were read at 405 nM in a microplate reader (BioRad, USA). The Vtg was quantified by constructing a calibration curve, preparing standards by

serial dilutions of the carp Vtg standard (Biosense) to give a range from 10 to 1000 ng/ml. Standard curves fitted by log-linear regression were used to quantify Vtg concentration, with R<sup>2</sup> values of 0.96 to 0.99.

Plasma concentrations of 11-KT and E2 were measured using EIA Kits (Estradiol EIA Kit and 11-KT EIA Kit, Cayman Chemicals, USA), in accordance with the kit protocols provided by Cayman Chemicals (20, 21). Both the assays are based on the competition between free estradiol or 11-KT and a tracer (estradiol linked to an acetylcholinesterase or 11-KT- acetylcholinesterase (AChE) molecule) for a limited number of estradiol or 11-KT-specific rabbit antiserum binding sites. The concentration of the estradiol tracer (or 11-KT tracer) is held constant while the concentration of free estradiol or 11-KT (standard or sample) varies, the amount of free estradiol (or 11-KT) tracer is able to bind to the rabbit antiserum will be inversely proportional to the concentration of free estradiol (or 11-KT) in the well. This rabbit antiserum estradiol (or 11-KT) (either free or tracer) complex binds to the rabbit IgG mouse monoclonal antibody that has been previously attached to the well. The plate is washed to remove any unbound reagents and then Ellman's Reagent (which contains the substrate to AChE) is added to the well. Plasma steroid concentrations were measured by constructing standard curves, using standard estradiol and 11-KT and standard serial dilutions to a range between 7.8 and 1,000 pg/ml and a computer spreadsheet provided by Cayman Chemical for data analysis was used to calculate the assay results.

After blood sampling, fish were euthanized and dissected to remove the organs (gonad and liver) and then weighed. The gonadosomatic index (GSI) and the hepatosomatic index (HSI) were determined in order to assess exposure effects at the organism level. The indices were calculated as follows:  $GSI = (\text{gonad weight} / \text{total body weight}) \times 100$  and  $HSI = (\text{weight} / \text{total body weight}) \times 100$ , respectively.



After sub-samples (from caudal and mid portions) of the removed gonads had been taken and placed in Bouin-Hollande fixative for 48 h, they were washed and placed in a series of graded ethanol and subsequently embedded in paraffin wax blocks using conventional techniques, as described in Martoja and Martoja (22). Sections were cut (5-7  $\mu\text{m}$ ) and stained with haematoxylin and eosin (H&E). Male gonads were evaluated by histological observation, using a microscope (Leica-ATC 2000, Germany), and classified at one of four maturation stages, according to the scale proposed by Gupta (23).

## **STATISTICAL ANALYSIS**

Statistical analysis of the results was carried out by one-way ANOVA, after the data had been checked for assumptions of normality and homogeneity and, if necessary, appropriately transformed. The post-hoc Tukey test was used to compare pairs of means and detect significant differences. Correlation analysis (Pearson) was carried out to examine the significance of the relationships between vitellogenin and GSI, HSI and steroids concentrations. The software *Statistica 5.0* (Statsoft Inc., USA) was used for the data analysis. *Microplate Manager 4.0* (BioRad Software) was used to construct a standard curve and determine vitellogenin concentrations, by extrapolating observances to the standard curve.

## **RESULTS**

### **Biological Assays**

At the end of the experiment cumulative male mortality was less than 10% for all treatments.

The highest levels of plasma vitellogenin ( $262 \pm 19.7 \mu\text{g/ml}$ ) were registered in male fish exposed to 100% of treated sewage effluent. The Vtg measurements for fish exposed to different concentrations of treated sewage effluent were significantly ( $P < 0.01$ ) different from controls and also among treatments (Fig.1).

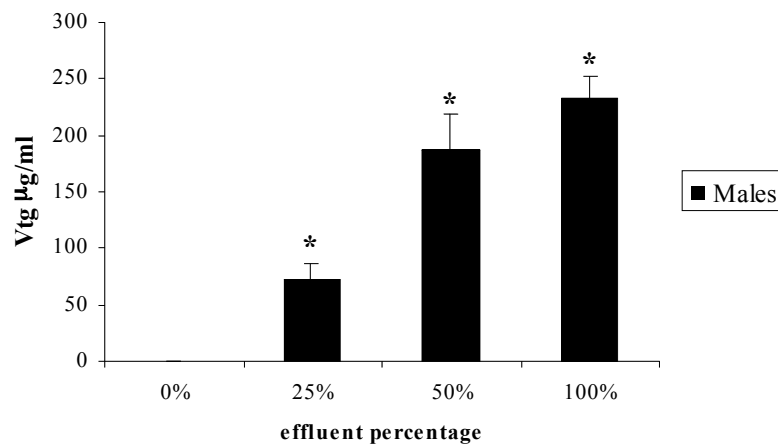


Figure 1: Vtg concentrations in exposed fish. Significant differences from controls if (\*).

Regarding Vtg measurements in liver and gonad homogenates, results show that the liver registers the greatest concentrations of this protein (Fig. 2). However, no significant differences were observed among treatments as far as liver Vtg and gonad Vtg is concerned. Statistical analysis revealed that plasma Vtg and Vtg in the liver homogenate were significantly correlated ( $r = 0.66$ ;  $P < 0.01$ ). A significant correlation was also observed between Vtg plasma and Vtg in the gonad homogenate ( $r = 0.37$ ;  $P < 0.01$ ).

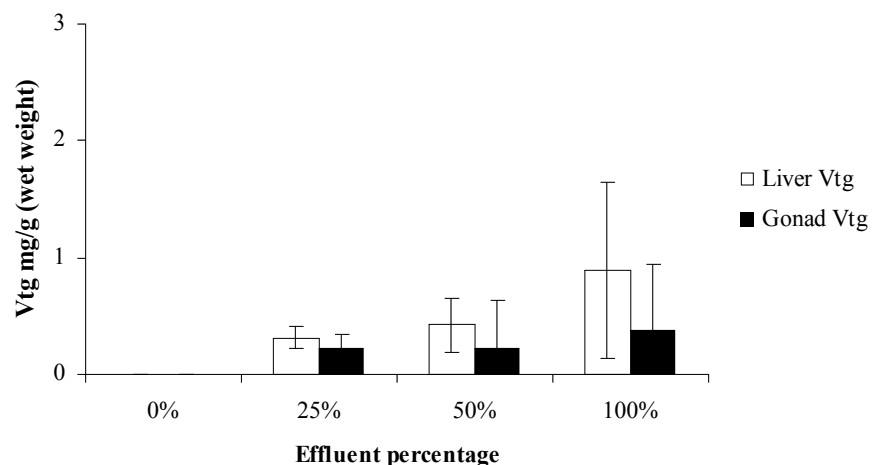


Fig. 2: Vtg concentrations in liver and gonad homogenates.

The steroid determination revealed a significant increase ( $P < 0.01$ ) in E2 concentrations in fish exposed to the different concentrations of sewage effluent. The highest levels of E2 ( $4410 \pm 564$  pg/ml) were recorded in fish exposed to 100% treated sewage effluent. The concentrations of plasma 11-KT diminished significantly in comparison with controls (Fig.3). A significant negative correlation was found between 11-Kt and E2 ( $r = -0.62$ ;  $P < 0.01$ ).

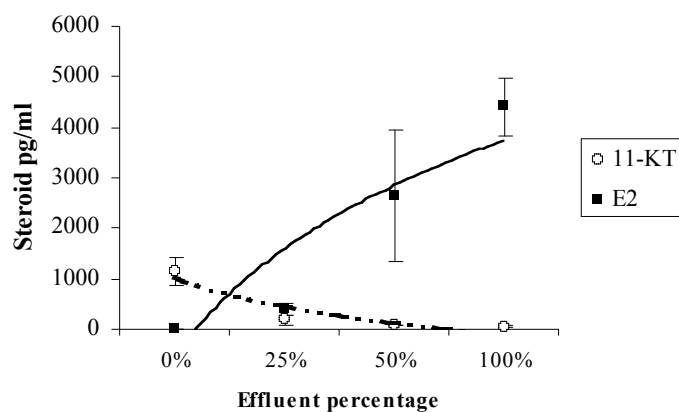


Figure 3: Steroid concentrations in fish exposed to the different concentrations of treated effluent.

The GSI calculated showed a significant ( $P<0.01$ ) decrease in all treatments in comparison with controls, while the lowest values ( $1.70\pm0.21$ ) were identified in fish exposed to 100% treated sewage effluent. A significant negative correlation was detected among plasma Vtg ( $r= -0.90$ ;  $P<0.01$ ), liver Vtg ( $r= -0.63$ ;  $P<0.01$ ) and the GSI. The hepatosomatic index (HSI) analysis revealed that there were no significant differences between controls and exposed males (Fig.4).

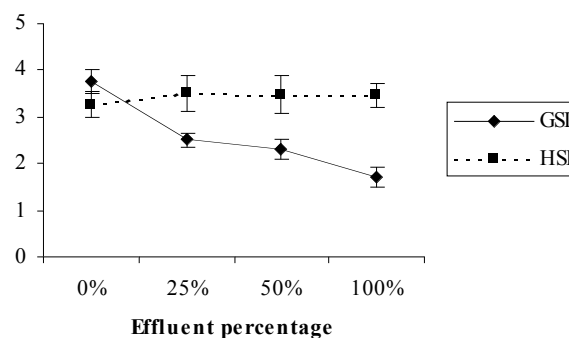


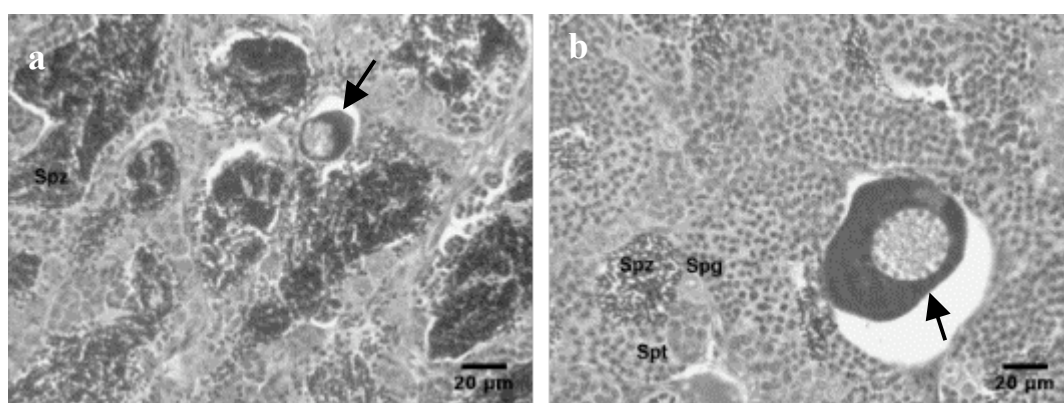
Figure 4: Gonadosomatic and hepatosomatic indices.

After the experiment period the testes of control fish had a normal appearance and the spermatogenesis was active. When the testes were examined, they showed cells at all spermatogenic stages and were classified as maturing (Stage II). The lumina were filled with spermatozoa and the lobules contained spermatogenic cysts. No ovo-testis condition was observed in male control fish.

The histopathological analysis of the treated testes showed that treated sewage effluent has a negative effect, causing changes at tissue and cell level. Fish exposed to 25% treated effluent appeared similar to the controls, except for the fact that some of the sperm cells seemed to be hypertrophied.

Fish exposed to 50% and 100% sewage effluent exhibited spermatozoa in the seminiferous lobules but the seminiferous lobules seemed to have a more diminished

diameter than in previous treatments. The tissue seems to have degenerated and hypertrophied cells were observed around seminiferous lobules (Fig. 5a). Some fish exposed to 100% of the effluent presented regressed testes and spermatogenesis seemed to be inhibited. The development of gonadal ducts was not detected in fish gonads. However, histological observation showed a few oocytes (Fig. 5 a and b) scattered within the testis tissue in fish exposed to different concentrations of treated sewage effluent (50 and 100%).



Figures 5a and b: Ova-testis in fish exposed to 100% treated effluent. Spz (spermatozoa), Spg (spermatogonia), Spt (spermatocytes); Oocyte (arrowhead).

### Analytical chemistry

The results for the estrogenic compounds selected are shown in Table 1 and Table 2. They report the concentrations after the operations listed.

Table 1: Alkylphenolic compounds and BPA concentrations (µg/l) in samples measured by LC-MS-MS

Treatment steps	BPA	OP	OP1EC	OP2EC	NP	NP1EC	NP2EC	NPEO (n=3-15)
Screening	1.55	0.46	<ld	0.31	1.17	0.58	2.40	76.50
Grit removal	0.15	<ld	<ld	0.28	0.52	0.62	1.96	54.50
Filtration	0.31	<ld	<ld	1.80	0.13	1.82	12.00	15.40
UV disinfection	<ld	<ld	<ld	3.11	0.70	2.91	94.20	4.50

ld - detection limit; BPA - bisphenol A; OP – octylphenol; OP1EC - octylphenol carboxylate; OP2EC - octylphenol ethoxy carboxylate; NP – nonylphenol; NP1EC - nonylphenol carboxylate; NP2EC - nonylphenol ethoxy carboxylate; NPEO - nonylphenol ethoxylates (sum of oligomers with 3 to 15 ethoxy groups).

Table 2 - Steroids concentrations (ng/l) in samples measured by LC-MS-MS

Treatment steps	E2-gluc	E1-sulf	E3	E2	EE2	E1	DES
Screening	nd	8.4	52.8	nd	nd	39.6	nd
Grit removal	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Filtration	nd	3.5	nd	nd	nd	nd	nd
UV disinfection	nd	3.4	nd	nd	nd	nd	nd

nd - not detectable; E2-gluc: b-estradiol 17glucuronide; E1-sulf: estrone 3-sulfate; E3: estriol; E2: 17β-estradiol; EE2: ethynyl estradiol; E1 estrone; DES: diethylstilbestrol; N=3 (mean value; sd<7%)

## DISCUSSION

High plasma Vtg concentrations have been reported in wild male carp, *Cyprinus carpio* (24), in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (25) and in walleye (*Stizostedion vitreum*) (4) that are exposed to or live near sewage treatment plants. They have also been reported in laboratory studies with chemicals known to be present in sewage (26, 27).

The significant increases in plasma Vtg in male fish exposed to the different treated effluent concentrations indicate the estrogenic activity of the WWTP. In addition, the Vtg was detected in male livers and gonad homogenates, which in turn were significantly correlated to the plasma Vtg. If the presence of Vtg in male livers reflects the synthesis of Vtg in this organ, the existence of Vtg in the testes suggests that this protein reaches the testes via the circulatory system and may cause adverse effects. Folmar *et al.* (28) suggested that Vtg accumulates in the testis vasculature, through obstructive blockage, rather than in the gonadal tissue itself, which was further supported by the apparent lack of specific Vtg receptors in the testes of fish.

Sex steroid hormones play important roles at all stages of the reproductive cycle in vertebrates and most teleost fish. The role of the main androgen is played by 11-ketotestosterone, while testosterone is usually present in the blood at lower concentrations (29). Our results showed a decrease in 11-KT concentrations in fish exposed to the different dilutions of wastewater effluent and at the same time a significant increase in the plasma E2 concentrations. However, plasma steroids showed some individual variability. In addition, the statistical analysis revealed a significant negative correlation between 11-KT and E2. Studies from other authors have also demonstrated depressed levels of 11-KT or testosterone (T) and increasing concentrations of E2 in male fish plasma (3, 4). Additionally, Solé *et al* (14) have suggested that fish show lower T levels than those of normal males as a consequence of the reduced amount of testicular tissue rather than a diminished amount of T production per unit mass of testicular tissue.

Estrogenic substances present in wastewater are taken up by fish and thereby stimulate biosynthesis of Vtg. The increased Vtg levels stimulate the synthesis of endogenous E2 that again induces Vtg production. Therefore, the high levels of Vtg

observed in exposed male can be related to the increasing levels of circulating E2. In a field study, Vtg presence, or a change in the normal pattern, has been concomitant with altered plasma levels of sex steroids such as T and E2 in male carp (28).

In this study the GSI decreased, which is consistent with other studies that reported severe effects in gonad weight. For example, in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed in a treatment wetland, besides significant Vtg induction, the GSI was significantly reduced at the inflow site, however, no differences were observed in the HSI (30) and wild carp, *Cyprinus carpio*, collected near an WWTP showed a reduction in GSI (31).

Several studies carried out in the laboratory as well in the field have shown that EDCs can cause histological changes in testes and other organs such as the liver and kidney (32, 33). In fish exposed to EDCs, besides the observed increase in plasma Vtg, the most pronounced effects are the high incidence of ovo-testis in wild populations, especially those near WWTP effluent (34). In this study, fish exposed to 50 and 100% treated effluent show regressed testes, spermatogenesis inhibition, and oocyte development within testis tissue, suggesting that EDCs are affecting the endocrine system of the fish.

The effective operation of wastewater treatment plants plays an important role in minimizing the release of xenobiotic compounds into the aquatic environment (35). The biodegradation of APEOs is limited by the formation of relatively stable metabolites, nonylphenol and octylphenol, their mono- and diethoxylates, and mono carboxylic acids, in particular (36). In the present study the nonylphenolic compounds were in the form of persistent metabolites, the most abundant being nonylphenoxy carboxylic acids (Table 2). Studies carried out in some Switzerland rivers have found similar results showing that the total concentration of the nonylphenoxy carboxylic acids was



significantly higher than that of the lipophilic metabolites and the estrogenic metabolites often exceeded the predicted no-effect concentration of 0.33 µg/L proposed in a risk assessment report to the European Union (37). Spengler *et al.* (38) suggested that the relatively high concentration may result from its semipolar character, which leads to a less pronounced tendency to adsorb to suspended particles than that of the hydrophobic NP.

Elevated levels of APE metabolites were found in the influent of the WWTP and, although the station treatment processes were able to remove substantial amounts of the compound, it was still possible to find metabolites in the treated effluent (Table 2).

The mean value for BPA in the WWTP treated effluent was below the detection limit (Table 2). However, after sand filtration the effluent showed a mean value of 310 ng/L, which is in the same range as the concentrations found in other WWTP effluents (39, 40). Nevertheless, the levels measured in the present study are not likely to produce estrogenic effects in the aquatic ecosystem if we take the estuarine water dilution effects into consideration.

According to Spengler *et al.* (38), steroids (except for mestranol) are found in almost 80% of WWTP effluents. Although, the steroids investigated could not be detected, with the exception of E1 (Table 3), that does not mean that they are not present in the WWTP effluent. A possible explanation for the non-detection was the low sample volume collected (300 ml) which may not have been enough to detect the low levels of steroids usually present in domestic WWTP effluents.

However, the concentrations of the selected EDC are considered weak and by itself they do not explain the biological results. Therefore, the results may suggest the

presence of other EDCs that can cause the observed results. Another possibility is that EDCs, although weak, can act additively.

As a concluding remark, the chemical identification and quantification of certain EDCs, combined with the biological data, in the treated effluent provide an integrated measure of the total estrogenic potency of the effluent and result in a more comprehensive characterization of the WWTP effluent.

### **Supporting Information Available**

Table 1 shows the LC-MS-MS conditions and limits of detection.

### **LITERATURE CITED**

- (1) Vos, J.G.; Dybing E.; Greim, H.A.; Ladefoged, O.; Lambré, C.; Tarazona, J.V.; Brandt, I.; and Vethaak, A.D. Health Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals on Wildlife, with Special Reference to the European Situation. *Crit. Rev. in Toxicol.* **2000**, 30 (1),71-133.
- (2) Folmar, L. C.; Hemmer, M. J.; Denslow, N. D.; Kroll, K.; Chen, J.; Cheek, A.; Richman, H.; Meredith, H.; Grau, E. G. A comparison of the estrogenic potencies of estradiol, ethynylestradiol, diethylstilbestrol, nonylphenol and methoxychlor in vivo and in vitro. *Aquat. Toxicol.* **2002**, 60 (1-2): 101-110.
- (3) Bjerselius, R.; Lundstedt-Enkel K.; Olsen, H.; Mayer, I.; Dimberg, K. Male goldfish reproductive behaviour and physiology are severely affected by exogenous exposure to 17 $\beta$ -estradiol. *Aquat. Toxicol.* **2001**, 53, 139-152.

- (4) Folmar, L.C.; Denslow, N.D.; Kroll, K.; Orlando, E.F.; Enblom, J.; Marcino, J.; Metcalfe C.; Guillette, L.J. Altered serum sex steroids and vitellogenin induction in walleye (*Stizostedion vitreum*) collected near a metropolitan sewage treatment plant. *Arch.Env. Cont. and Toxicol.* **2001**, 40 (3): 392-398.
- (5) Coldham, N. G.; Sivapathasundaram, S.; Dave, M.; Ashfield, L. A.; Pottinger, T. G.; Goodall, C.; Sauer, M. J. (1998). Biotransformation, tissue distribution, and persistence of 4-nonylphenol residues in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Drug Metab. Disposition* **1998**, vol. 26, no. 4, pp. 347-354.
- (6) Furhacker, M.; Scharf, S.; Weber, H. Bisphenol A: emissions from point sources. *Chemosphere* **2000**, 41, 751-756.
- (7) Tyler, C. R.; and Routledge, E. J. Oestrogenic effects in fish in English rivers with evidence of their causation. *Pure and Appl. Chem.* **1998**, 70 (9): 1795-1804.
- (8) Heppell, S. A.; Denslow, N. D.; Folmar, L. C.; and Sullivan, C. V. Universal Assay of Vitellogenin as a Biomarker for Environmental Estrogens. *Environ. Health Perspect.* **1995**, 103(Suppl 7):9-15.
- (9) Folmar, L. C.; Gardner, G. R.; Schreiber, M. P.; Magliulo-Cepriano, L.; Mills, L. J.; Zarogian, G.; Gutjahr-Gobell, R.; Haebler, R.; Horowitz, D. B.; Denslow, N. D. Vitellogenin-induced pathology in male summer flounder (*Paralichthys dentatus*). *Aquat. Toxicol.* **2001**, 51, 431-441.
- (10) Jobling, S.; Nolan, M.; Tyler, C. R.; Brighty, G.; Sumpter, J. P. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environ. Sci. and Tech.* **1998**, vol. 32, no. 17, pp. 2498-2506.

- (11) Thompson, S.; Tilton, F.; Schlenk, D.; Benson, W.H. Comparative vitellogenic responses in three teleost species: extrapolation to in situ field studies. *Mar. Environ. Res.* **2000**, 50(1-5):185-9.
- (12) Tyler, C. R.; Van Der, E. B.; Jobling, S.; Panter, G.; and Sumpter, J. P. Measurement of vitellogenin a biomarker for exposure to oestrogenic chemicals, in a wide variety of cyprinid fish. *J. Comp. Physiol. B.* **1996**, 166, 418-26.
- (13) Noaksson, E.; Linderöth, M.; Bosveld, A. T. C.; and Balk, L. Altered steroid metabolism in several teleost species exposed to endocrine disrupting substances in refuse dump leachate. *Gen. and Comp. Endoc.* **2003**, 134, 273–284.
- (14) Solé, M.; Raldúa, D.; Piferrer, F.; Barceló, D.; Porte, C. Feminization of wild carp, *Cyprinus carpio*, in a polluted environment: plasma steroid hormones, gonadal morphology and xenobiotic metabolizing system. *Comp. Biochem. And Physiol. Part C* **2003**, 136, 145-156.
- (15) Petrovic, M.; Barceló, D. Review of Advanced Sample Preparation Methods for the Determination of Alkylphenol Ethoxylates and Their Degradation Products in Solid Environmental Matrices. *Chromatographia* **2002**, 56, 535-544.
- (16) Petrovic, M.; Eljarrat, E.; Lopes de Alda, M.J.; Barceló, D. Recent advances in the mass spectrometric analysis related to endocrine disrupting compounds in aquatic environmental samples. *J. Chromat. A* **2002**, Volume 974, Issues 1-2, 23 - 51.
- (17) Petrovic, M.; Diaz, A.; Ventura, F.; Barceló, D. Low Nanogram Per Liter Determination of Halogenated Nonylphenols, Nonylphenol Carboxylates and Their

Non-Halogenated Precursors in Water and Sludge by Liquid Chromatography-Electrospray-Tandem Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2003**, 14, 516-527.

(18) Rodriguez-Mozaz, S., Lopez de Alda, M. J., Barcelo, D. Picogram per Liter Level Determination of Estrogens in Natural Waters and Waterworks by a Fully Automated On-Line Solid-Phase Extraction-Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry Method. *Anal. Chem.* **2004**, 76(23), 6998-7006.

(19) Denslow, N. D.; Chow, M. C.; Kroll, K. J., Green, L. Vitellogenin as a biomarker of exposure for estrogen or estrogen mimics. *Ecotoxicology* **1999**, 8, 385-398.

(20) Cayman chemical. Estradiol Enzyme Immunoassay Kit. Ann Arbor, Mi, USA. **2002**, P. 34.

(21) Cayman chemical. 11-Ketotestosterone Enzyme Immunoassay Kit. Ann Arbor, Mi, USA. **2003**, P. 34.

(22) Martoja, R.; et Martoja, M. Initiation aux techniques de l'histologie animal. Masson et Lie, Paris, **1967**, 345 pp.

(23) Gupta, S. The development of carp gonads in warm water aquaria. *J. Fish Biol.* **1975**, 7, 775-782.

(24) Solé, M.; Barceló, D.; Porte, C. Seasonal variation of plasmatic and hepatic vitellogenin and EROD activity in carp, *Cyprinus carpio*, in relation to sewage treatment plants. *Aquat. Toxicol.* **2002**, 60, 233–248

- (25) Harries, J. E.; Janbakhsh, A.; Jobling, S.; Matthiessen, P.; Sumpter, J. P., Tyler, C. R. Estrogenic potency of effluent from two sewage treatment works in the United Kingdom. *Environ. Toxicol. and Chem*, **1999**, 18, 5, 932-937.
- (26) Casini, S.; Fossi, M.C.; Mori, G.; Bjornstad, A. Vitellogenin induction in *Cyprinus carpio* treated with 17 beta-estradiol and 4-nonylphenol. *Environmental Monitoring and Assessment*. **2002**, 75, 3, 235-239.
- (27) Christiansen, L. B.; Pedersen, K. L.; Korsgaard, B.; Bjerregaard, P. Estrogenicity of xenobiotics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using in vivo synthesis of vitellogenin as a biomarker. *Mar. Environ. Res.* **1998**, 46, 1-5, 137-140.
- (28) Folmar, L. C.; Denslow, N. C.; Rao, V.; Chow, M.; Crain, D. A.; Enblom, J.; Marcino, J.; Guillette, L. J. Jr. Vitellogenin induction and reduced serum testosterone in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environ. Health. Perspect.* **1996**, 104, 1096-1101.
- (29) Kime, D. E.; Nash, J. P.; Scott, A. P. Vitellogenesis as a biomarker of reproductive disruption by xenobiotics. *Aquaculture* **1999**, 177, 345–352.
- (30) Hemming, J. M.; Waller, W.T.; Chow, M.C.; Denslow, N.D.; Venables, B. Assessment of the estrogenicity and toxicity of a domestic wastewater effluent flowing through a constructed wetland system using biomarkers in male fathead minnows (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). *Environ. Toxicol. and Chem.* **2001**; 20, 10, 2268-2275.

- (31) Lavado, R.; Thibaut, R.; Raldua, D.; Martin, R.; Porte, C. First evidence of endocrine disruption in feral carp from the Ebro River. *Toxicol. And Appl. Pharm.* **2004**; 196, 2, 247-257.
- (32) Panter, G. H.; Thompson, R. S.; Sumpter, J. P. Adverse reproductive effects in male fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to environmentally relevant concentrations of the natural oestrogens, oestradiol and oestrone. *Aquat. Toxicol.* **1998**, 42, 243–253.
- (33) Schwaiger, J.; Spieser, O. H.; Bauer, C.; Ferling, H.; Mallow, U.; Kalbfus, W.; Negele, R. D. Chronic toxicity of nonylphenol and ethinylestradiol: haematological and histopathological effects in juvenile Common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquat. Toxicol.* **2000**, 51, 1, 69-78.
- (34) Solé, M.; Porte, C.; Barceló, D. Analysis of the estrogenic activity of sewage treatment works and receiving waters using vitellogenin induction in fish as biomarker. *Trends Anal Chem.* **2001**, 518– 25.
- (35) Byrns, G. The Fate of Xenobiotic Organic Compounds in Wastewater Treatment Plants. *Wat. Res.* **2001**, 35, 10, 2523–2533.
- (36) Johnson, A.; Sumpter, J. Removal of Endocrine-Disrupting Chemicals in Activated Sludge Treatment Works. *Environ. Sci. & Tech.* **2001**, 35, 24, 4697 – 4703.
- (37) Ahel, M.; Molnar, E.; Ibric, S.; Giger, W. Estrogenic metabolites of alkylphenol polyethoxylates in secondary sewage effluents and rivers. *Water Sci. and Tech.* **2000**, 42, 7-8, 15-22.

(38) Spengler, P.; Korner, W.; Metzger, J. W. Substances with estrogenic activity in effluents of sewage treatment plants in southwestern Germany. 1. Chemical analysis. *Environ. Toxicol and Chem.* **2001**; 20, 10, 2133-2141.

(39) Ding, H. W.; Wu, C. Y. Determination of Estrogenic Nonylphenol and Bisphenol A in River Water by Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of the Chinese Chemical Society.* **2000**, 47, 1155-1160.

(40) Belfroid, A.; van Velzen, M.; van der Horst, B.; Vethaak, D. Occurrence of bisphenol A in surface water and uptake in fish: evaluation of field measurements. *Chemosphere* **2002**, 49 (1): 97-103.



## **5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES**

## 5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Nos últimos 50 anos, alguns compostos sintéticos como os APEO e PCB, foram largamente utilizados em variadas aplicações industriais, comerciais e domésticas, sendo parte deles libertados no meio aquático. Alguns destes compostos xenobióticos, presentes em efluentes de ETAR e lamas industriais, são estrogénicos (tais como o nonilfenol, outros derivados de alquilfenóis, PCB's, dietil-etoxilatos, etc.), e podem induzir alterações nas funções endócrinas de peixes e outros organismos, nomeadamente o desequilíbrio das populações relativamente à composição (macho / fêmea) (Preziosi, 1998).

Por este motivo, existe actualmente uma preocupação crescente sobre o uso indiscriminado destes compostos, principalmente devido à relativa estabilidade de alguns metabolitos de degradação de produtos contendo APEO, gerados durante os processos de tratamento de águas residuais (Nicols *et al.*, 2001; Blackburn and Waldock, 1995).

Já foi demonstrado que o nonilfenol é tóxico, tanto para espécies de água doce como para espécies marinhas, induzindo respostas estrogénicas na truta macho e revelando efeitos de bioacumulação em organismos de água doce (Purdom *et al.*, 1994). Assim, é cada vez maior a convicção de que estes compostos sintéticos podem constituir potenciais desreguladores endócrinos, mesmo quando presentes em concentrações extremamente baixas (abaixo das ng/l) (Purdom *et al.*, 1994, Routledge *et al.*, 1998).

Apesar das elevadas descargas nos meios receptores e da sua potencial toxicidade, a informação disponível é ainda muito limitada, relativamente ao efeito dessas descargas nos meios receptores, nomeadamente em sistemas aquáticos.

Apesar dos recentes avanços registados no tratamento de águas residuais alguns estudos demonstraram que no que respeita à remoção de alguns EDC este tratamento ainda é muito deficiente constituindo, muitas vezes, apenas um meio para alterações ao nível da cadeia destes compostos e não propriamente uma forma de os remover evitando a sua descarga nos meios aquáticos.

Por outro lado, e apesar de existirem alguns estudos, ainda é muito escassa a informação sobre a remoção de EDC em ETAR, circunstância que impede a

realização de estimativas de balanços materiais, indispensáveis à previsão dos correspondentes impactes nos meios hídricos (Jobling *et al.*, 1998).

As ETAR recebem um largo espectro de compostos químicos provenientes da actividade doméstica e industrial, existindo uma estreita possibilidade de receberem EDC, mas cuja actividade estrogénica ainda não foi identificada (Ternes, 1998, Ternes *et al.*, 1999 a). Desta forma, uma mistura complexa de moléculas incluindo EDC na sua forma original (total ou parcialmente removidos) ou metabolitos formados durante o processo de tratamento são descarregados nos respectivos meios receptores. Neste contexto, as descargas das ETAR são consideradas a maior fonte estrogénica para o meio aquático, nomeadamente para a poluição das águas de superfície, conduzindo, desta forma, para a contaminação ambiental.

## **5.1. PRESENÇA DE EDC NUMA ETAR PORTUGUESA**

O presente estudo foi realizado na ETAR de Chelas, em Lisboa que trata aproximadamente 50 000 m<sup>3</sup> / dia de água residual, o que corresponde aproximadamente a 211 000 habitantes equivalentes. O efluente da ETAR é caracterizado por não ser só, efluente doméstico mas também ser constituído por quantidades significativas de efluente industrial. A escolha desta ETAR para realizar este estudo recaiu também na sua linha de tratamento, isto é, a ETAR possui tratamento terciário com remoção de azoto e desinfecção final do efluente através de U.V. após uma filtração do efluente secundário.

É extremamente difícil, ou até mesmo impossível identificar todos os EDC presentes numa ETAR, mesmo os já identificados como tal. Por esse motivo muitos autores tentaram detectar e quantificar o potencial estrogénico de uma água através da identificação e quantificação de compostos específicos (EDC específicos), podendo ser de origem natural (17  $\beta$ -estradiol) e, ou de origem sintética (17  $\alpha$ -etinilestradiol) (Solé *et al.*, 2000), ou, por outro lado, através da avaliação da actividade estrogénica (Korner *et al.*, 1999).

Desta forma, e uma vez que no caso deste estudo seria impraticável a identificação e quantificação de todos os EDC, foram seleccionados alguns EDC “alvo”,

nomeadamente: (i) alquilfenóis etoxilatos (nonilfenol e octilfenol) (NP e OP); (ii) bisfenol A (BPA) e (iii) 17  $\beta$ -estradiol (E2). Estes compostos foram seleccionados com base no seu conhecido potencial estrogénico, que foi demonstrado em diversos estudos.

Devido ao elevado número de técnicas existentes no mercado para análise de EDC, optou-se por testar várias técnicas, de modo a poder também ter maior fiabilidade das conclusões retiradas do estudo. Desta forma foram utilizadas três técnicas diferentes para identificar e quantificar os EDC seleccionados. Em todos os casos, isto é, independentemente da técnica analítica usada (ELISA, LC-MS-MS e HPLC), ficou demonstrado que os EDC seleccionados estavam presentes no efluente da ETAR, variando as suas concentrações de composto para composto e também ao longo da linha de tratamento da ETAR, e que ainda são descarregadas, no Estuário do Tejo, níveis de concentrações que poderão causar efeitos fisiológicos na vida animal. Contudo, devido ao elevado nível de diluição existente no Estuário do Tejo (caudais muito grandes) os efeitos nos organismos poderão não ser relevantes e, ou imediatos.

Os níveis mais elevados de APE (NP e OP) foram detectados no afluente à ETAR e os menores no efluente da ETAR. No que diz respeito ao efluente final os resultados obtidos através do kit ELISA são superiores aos obtidos por LC-MS-MS, o que indica que os valores foram sobrestimados pelo primeiro método. Contudo, os resultados obtidos por LC-MS-MS após a operação de filtração são superiores aos obtidos pelos kits ELISA, facto esse que não é facilmente explicável.

Nos estudos realizados por Goda *et al.*, (2000) mostrou-se que devido às reacções cruzadas (cross-reactivity) existentes nas técnicas de ELISA, que podem interferir na determinação e quantificação de EDC, os resultados obtidos poderão ser sobrestimados, isto é, valores superiores aos reais. Desta forma, algumas diferenças registadas dos resultados obtidos entre as diferentes técnicas analíticas podem ser explicadas pelo fenómeno “cross-reactivity” (Oubina *et al.*, 1997).

O valor mais elevado de E2 foi registado após a decantação primária. A variação de E2 ao longo da linha de tratamento foi pouco significativa, facto este que poderá estar relacionado também com a “cross-reactivity”, bem como a própria actividade microbiológica existente numa água residual. Contudo, não se conseguiram obter resultados através de LC-MS-MS. Este facto pode não significar que o composto não esteja presente, mas sim que esta técnica não é suficientemente sensível para o

detectar, isto é a concentração a que poderá estar presente o E2, na água residual em estudo, poderá estar abaixo do nível de detecção do LC-MS-MS. Uma possível explicação para este facto poderá ser o volume recolhido de amostra, isto é, o volume de amostra recolhido poderá ter sido suficiente para a análise através de ELISA, não sendo contudo suficiente para a análise por LC-MS-MS.

Os maiores valores para o BPA foram obtidos nas lamas primárias (acima dos limites de detecção), tendo sido registado uma redução significativa deste composto ao longo da linha de tratamento, o que poderá indicar que a ETAR de Chelas remove eficientemente este composto. Contudo, para este composto, as técnicas analíticas não são comparáveis, apesar de se terem registado níveis semelhantes de concentração para as duas técnicas. Pôde-se ainda concluir que o kit ELISA pode ser utilizado com segurança.

Este estudo permitiu ainda concluir que os kits ELISA testados podem ser utilizados para monitorização destes EDC seleccionados, contudo dever-se-ão ter alguns cuidados acrescidos quando se trata de analisar valores absolutos, ou utilizá-los para analisar uma possível cinética de remoção.

Em conclusão e uma vez que o efluente tratado é descarregado no Estuário do Tejo que tem muitas utilizações públicas (recreio, pesca etc.), dever-se-á prestar maior atenção (se possível até mesmo evitar), a este tipo de descargas que poderão resultar em problemas para a saúde pública. Embora estas descargas usufruam do grande poder de diluição do Tejo, não se deixar de notar que o Tejo recebe, ao longo do seu percurso inúmeras descargas de efluentes que podem ter sido, ou não tratadas.

## **5.2. DESENVOLVIMENTOS FUTUROS**

### **Estudos em organismos e Humanos**

A informação existente é ainda muito incipiente no que respeita aos efeitos provocados pela exposição de EDC em organismos e Humanos. Não existe praticamente informação sobre o efeito de um determinado EDC, normalmente tratam-se de misturas de EDC, bem como as diferenças geográficas e sobre a evolução temporal das concentrações.

## **Métodos de análise de EDC**

As metodologias existentes devem ser melhoradas de forma a poderem ser perfeitamente comparáveis e de modo a serem obtidos valores fiáveis.

## **ESTUDOS FUTUROS EM ETAR**

Torna-se urgente e necessário obter informação técnica e científica que permita otimizar o tratamento terciário de águas residuais, esclarecendo a importância relativa das fracções solúvel e particulada de EDCs, simultaneamente presentes numa descarga, para a correspondente estrogenicidade global.

Desta forma, a avaliação e o estudo da estrogenicidade nas fracções consideradas, consoante os diferentes tipos de águas residuais e os diferentes tipos de tratamento, será da maior importância porque permitirá melhorar a remoção de EDC no tratamento terciário, através da utilização de diversas tecnologias (ex: filtração simples, micro e nano filtração, adsorção utilizando diferentes tipos de carvão activado).

## **REFERÊNCIAS**

Blackburn, M.A., Waldock, M.J. (1995). Concentrations of alkylphenols in rivers and estuaries in England and Wales. *Water Research*. vol. 29, no. 7, pp. 1623-1629.

Goda, Y., Kobayashi, K., Fukuda, S., Fujimoto, M., Ike, M. and Fujita, M. (2000). Development of the ELISAs for detection of hormone-disrupting chemicals. *Water Science and Technology*, 42 (7-8), 81-88.

Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C.R., Brighty, G., Sumpter, J.P. (1998). Widespread sexual disruption in wild fish. *Environmental Science and Technology*, vol. 32, no. 17, pp. 2498-2506.

Korner, W., Hanf, V., Schuller, W., Kempter, C., Metzger, J., Hagenmaier, H. (1999). Development of a sensitive E-screen assay for quantitative analysis of estrogenic

activity in municipal sewage plant effluents. *Science of the Total Environment*, 225:33–48.

Nichols, K.M., Snyder, E.M., Snyder, A., Pierens, S.L., Miles-Richardson, S.R. And Giesy, J.P. (2001). Effects of nonylphenol ethoxylate on reproductive output and bioindicators of environmental estrogen exposure in fathead minnows, *Pimephales promelas*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol.20,Nº3, 510-522.

Oubina, A., Gascón, J., Barceló, D. (1997). Multianalyte effect in the determination of cross-reactivities of pesticide immunoassays in water matrices. *Analytica Chimica Acta*, 347, 121-130.

Preziosi, P. (1998). Endocrine disrupters as environmental signallers: an introduction. *Pure Applied Chemistry*, 1998;70:1617 –1631.

Purdom, C.E., Hardiman, P.A., Bye, V.J., Eno, N.C., Tyler, C.R., Sumpter, J.P (1994). Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chemical Ecology*, 8:275 –285.

Routledge, E.J., Sheahan, D., Desbrow, C., Brighty, G.C., Waldock, M., Sumpter, J.P. (1998). Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. *Environmental Science and Technology*, vol. 32, no. 11, pp. 1559-1565.

Solé, M., Porte, C., Barceló, D., (2000). Vitellogenin Induction and Other Biochemical Responses in carp, *Cyprinus carpio*, After Experimental Injection with  $17\alpha$  – Ethynylestradiol. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 38, 494-500.

Ternes, T.A. (1998). Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research*, 32(11): 3245–60.

Ternes, T.A., Stumph, M., Mueller, J., Haberer, K., Wilken, R.D., Servos, M. (1999a). Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants. I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *The Science of the Total Environment* 225, 81–90.